

2004



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Campus da Zapateira s/n. 15071 A Coruña. España. Telf. 981167000. Fax 981167065

11

**DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PESTICIDAS
ORGANOCLORADOS EN MATRICES AMBIENTALES**

Memoria presentada por
Estefanía Concha Graña
para optar al
Grado de Doctora en Química

A Coruña, julio de 2004



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Campus da Zapateira s/n. 15071 A Coruña. España. Telf. 981167000. Fax 981167065

Dra. Dña. SOLEDAD MUNIATEGUI LORENZO, Catedrática y Directora del Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña,

AUTORIZA a Dña. ESTEFANÍA CONCHA GRAÑA a presentar el trabajo titulado "DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN MATRICES AMBIENTALES" para optar al grado de Doctora en Química.

A Coruña, julio de 2004



Dra. Dña. Soledad Muniategui Lorenzo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Campus da Zapateira s/n. 15071 A Coruña. España. Telf. 981167000. Fax 981167065

Dra. Dña. SOLEDAD MUNIATEGUI LORENZO, Dra. Dña. PURIFICACIÓN LÓPEZ MAHÍA, Catedráticas y Dra. Dña. ISABEL TURNES CAROU, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña,

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada "DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN MATRICES AMBIENTALES", se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la presente en A Coruña, julio de 2004.

Dra. Dña. Soledad Muniategui Lorenzo

Dra. Dña. Purificación López Mahía

Dra. Dña Isabel Turnes Carou

El presente trabajo forma parte de los siguientes proyectos de investigación:

-“Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de hidrocarburos, pesticidas organoclorados y PCBs” (PGIDT00PXI10304PR) financiado por el Programa General de Investigación del Plan Galego de Investigación y Desenvolvemento Tecnolóxico de la Xunta de Galicia. 2000-2002.

-“Establecimiento de métodos analíticos, caracterización de la zona de estudio y seguimiento de los niveles de pesticidas en los procesos de biorremediación aplicados en los suelos afectados por HCH en el polígono de Torneiros” Convenio de Investigación con la Consellería de Medio Ambiente de la Xunta de Galicia. 2001-2003.

-“Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de pesticidas organoclorados en diversas matrices ambientales” financiado por la Universidade da Coruña durante el curso 2002-2003.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias al Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña y en particular a su directora Dra. Dña. Soledad Muniategui Lorenzo, por permitirme realizar este trabajo.

A mis directoras, Dra. Dña. Soledad Muniategui Lorenzo, Dra. Dña. Purificación López Mahía y Dra. Dña. María Isabel Turnes Carou por su orientación y apoyo.

Al Departamento de Química Analítica, al Instituto Universitario de Medio Ambiente y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidade da Coruña por la concesión de los contratos de investigación y las becas predoctorales que me han permitido dedicarme en exclusiva a la realización de esta tesis.

A la Universidade da Coruña, a la Xunta de Galicia y al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la concesión de los distintos proyectos que han financiado esta investigación.

Durante todos los años que dura la realización de una tesis, son muchas las cosas que se aprenden y que suponen un crecimiento no sólo a nivel profesional sino también personal. Quisiera dar las gracias a toda la gente con la que he compartido estos años y que han disfrutado y sufrido conmigo.

Gracias a Isa por darme ánimos cuando los necesitaba, a Puri por su eficacia y a Sol por dedicarme tanto tiempo y esfuerzo.

Gracias también a todos los profesores del Departamento, y en especial a Esther F., que es un ejemplo para todos, al igual que Darío y Alatzne que siempre se preocupan tanto por nosotros.

A Mónica quiero agradecerle su inestimable ayuda con el inglés y la estadística, a M^a Paz y a Pilar su sentido del humor que alegraron estos años en el laboratorio. Gracias a todos los compañeros que han pasado por el Departamento: Ana, Manu, Isa G., Miguel, Vila, José N., Izaskun, Diego, JR..., y a los que están ahora mismo: Gloria, Gus, Merce, Débora, Raquel, M^a Carmen, Sonia, María, Maribel...

Gracias a Ricardo, Carlos, Luz, Mónica, Merce, María, Bruno... por lo bien que lo hemos pasado.

Muchas gracias a Carmen, Chus y María. Juntas ya hemos compartido muchas cosas importantes, ¡y las que nos quedan! Gracias por estar siempre dispuestas a ayudar, y sobre todo a escuchar. Gracias a Vero peque, me encanta trabajar contigo y que me lleves la contraria.

A mis queridísimos Vero y Gerardo, que me han dado tantos consejos, y me han ayudado tanto. No tengo palabras para daros las gracias por todo lo que os debo, así que ya os invitaré a cenar un día.

Y por supuesto muchas gracias a mis padres, por apoyarme todos estos años. No sólo sufrieron mis nervios, sobre todos estos últimos meses, sino que incluso me han acompañado en algún muestreo. Gracias a Iria por preocuparse tanto, y también a Dani, que siempre lo pregunta todo y me hace pensar. Muchísimas gracias a Alberto, por cambiar mi vida. No sabes lo importante que es que te intereses por mi trabajo y que te sientas orgulloso.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Los pesticidas en el medioambiente	5
2. Características, propiedades y toxicología	11
3. Legislación	18
4. Referencias bibliográficas	23

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

CAPÍTULO III: DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

1. Introducción	35
2. Material, instrumental y reactivos	47
3. Estudio de la separación cromatográfica	49
4. Inyección <i>split/splitless</i>	56
5. Inyección <i>split/splitless</i> con temperatura programada y detección MS (PSS-GC-MS)	62
6. Inyección <i>split/splitless</i> con temperatura programada y detección ECD (PSS-GC-ECD)	76
7. Inyección de grandes volúmenes <i>on-column</i> y detección ECD (LVOCI-GC-ECD)	88
8. Comparación de los sistemas de inyección estudiados	111
9. Estudio de la degradación de endrín y p,p'-DDT con los distintos sistemas de inyección	114
10. Referencias bibliográficas	116

CAPÍTULO IV: EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MATRICES ACUOSAS

1. Introducción	127
2. Material, instrumental y reactivos	144
3. Estudio de la etapa de extracción en fase sólida (SPE)	146
4. Estudio de los fenómenos de adsorción de los pesticidas	156
5. Resumen y características analíticas del método de SPE desarrollado	165
6. Reducción del volumen de muestra mediante uso de la inyección PSS- GC-ECD	169
7. Microextracción líquido-líquido	171
8. Referencias bibliográficas	179

CAPÍTULO V: EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MATRICES SÓLIDAS

1. Introducción	193
2. Material, instrumental y reactivos	213
3. Extracción con agitación	215
4. Extracción con energía de microondas (MAE)	218
5. Extracción con líquidos a presión (PLE)	231
6. Estudio de la etapa de purificación	246
7. Comparación entre los distintos métodos de extracción optimizados	262
8. Aplicación del método de PLE al análisis de otras matrices sólidas	266
9. Referencias bibliográficas	272

CAPÍTULO VI: APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS DESARROLLADOS AL ESTUDIO DE UN ÁREA CONTAMINADA

1. Estudio de una zona altamente contaminada por residuos de pesticidas	287
2. Material, instrumental y reactivos	289
3. Caracterización del residuo	290
4. Caracterización de los suelos en la parcela de estudio	291
5. Análisis de lixiviados	305
6. Análisis de aguas de ríos adyacentes	307
7. Referencias bibliográficas	311

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

Figura I-1. Posible distribución y destino de pesticidas agrícolas y sus productos de degradación en la biosfera [Novotny y Olem, 1994].	8
Figura I-2. Ejemplo de biomagnificación en la cadena alimenticia (los números son valores representativos de la concentración de DDT y sus derivados en los tejidos [Kimball's-Biology-Pages, 2001]).	11
Figura I-3. Metabolismo del DDT. (a) Eliminación reductora de cloro, producida por un mecanismo anaerobio en el hígado, por bacterias sobre tejidos muertos o por algunos microorganismos. (b) Oxidación, producida por algunos insectos. (c) Deshidrocloración producida por la mayoría de los insectos, aves y mamíferos [Hassall, 1990].	14
Figura I-4. Lindano (γ -HCH).	15
Figura I-5. Algunos derivados de ciclodieno.	16
Figura I-6. Endosulfán y metabolitos.	18
Figura III-1. Inyector <i>split/splitless</i> .	40
Figura III-2. Esquema de un inyector tipo PTV [Mol y cols., 1995b].	41
Figura III-3. Esquema de un sistema de inyección de grandes volúmenes <i>on-column</i> (LVOCI).	44
Figura III-4. Condiciones con las que se obtiene la mejor separación para la columna Quadrex 007-608.	51
Figura III-5. Condiciones con las que se obtiene la mejor separación con la columna HP-5. Lista de compuestos en la figura III-4.	52
Figura III-6. Cromatogramas obtenidos con las columnas estudiadas en el equipo Autosystem XL. Lista de compuestos en la figura III-4.	53
Figura III-7. Condiciones con las que se obtiene la mejor separación con la columna DB-35MS. Lista de compuestos en la figura III-4.	55
Figura III-8. Condiciones con las que se obtiene la mejor separación con la columna DB-XLB con el inyector LVOCI. Lista de compuestos en la figura III-4.	56
Figura III-9. Variación de la respuesta en la inyección <i>split/splitless</i> con la temperatura del inyector.	57
Figura III-10. Variación de la respuesta en la inyección <i>split/splitless</i> con el flujo de <i>split</i> y el tiempo de purga.	58
Figura III-11. Cartas Pareto obtenidas para (a) γ -HCH y (b) β -endosulfán (inyección PSS-GC-MS).	67
Figura III-12. Cartas Pareto de segundo orden obtenidas para (a) γ -HCH y (b) β -endosulfán (inyección PSS-GC-MS).	68

Figura III-13. Cromatogramas obtenidos usando un <i>liner</i> vacío (A) o relleno con lana de vidrio (B) en la inyección PSS-GC-MS.	69
Figura III-14. Superficies de respuesta obtenidas para γ -HCH (lindano) y β -endosulfán (PSS-GC-MS).	71
Figura III-15. Cartas Pareto de primer y segundo orden obtenidas para (a) endrín y (b) p,p'-DDT (inyección PSS-GC-ECD).	80
Figura III-16. Gráfica de efectos principales obtenida para β -endosulfán (PSS-GC-ECD).	83
Figura III-17. Mecanismo de desolvatación de muestra en el LVOCI.	89
Figura III-18. Programa de temperatura del horno y cromatograma obtenido en las condiciones de LVOCI propuestas por el software del fabricante.	91
Figura III-19. Programa de temperatura del horno y cromatograma obtenido en el ensayo 1 (LVOCI-GC-ECD).	92
Figura III-20. Programa de temperatura del horno y cromatograma que se obtiene en las condiciones LVOCI del ensayo 2.	93
Figura III-21. Programa de temperatura del horno seleccionado y cromatograma obtenido en estas condiciones (LVOCI-GC-ECD).	94
Figura III-22. Cartas Pareto de primer y segundo orden para γ -HCH, $\gamma + \alpha$ -clordano y endosulfán sulfato (LVOCI-GC-ECD).	99
Figura III-23. Gráficas de probabilidad normal de efectos para γ -HCH, $\gamma + \alpha$ -clordano y endosulfán sulfato: (a) teniendo en cuenta todas las variables, (b) sin considerar la temperatura inicial del horno (factor B).	101
Figura III-24. Variación de la respuesta con la temperatura inicial del horno (LVOCI-GC-ECD).	103
Figura III-25. Variación de la respuesta con la velocidad de inyección (LVOCI-GC-ECD).	104
Figura III-26. Variación de la respuesta con el tiempo de cierre de la válvula de SVE (LVOCI-GC-ECD).	105
Figura III-27. Variación de la respuesta con la presión inicial (LVOCI-GC-ECD).	106
Figura III-28. Cromatograma obtenido cuando se aplica una presión inicial de 130 kPa (LVOCI-GC-ECD).	107
Figura III-29. Variación de la respuesta con la temperatura inicial del horno (LVOCI-GC-ECD).	108
Figura III-30. Cromatograma obtenido con el método optimizado de inyección <i>on-column</i> de grandes volúmenes (LVOCI).	109

Figura IV-1. Embudo de decantación para extracción líquido-líquido.	129
Figura IV-2. Esquema de un equipo de extracción con fluidos supercríticos.	131
Figura IV-3. Esquema del funcionamiento de la extracción en fase sólida.	135
Figura IV-4. Cartuchos (izquierda) y discos (derecha) de extracción en fase sólida.	137
Figura IV-5. Sistema de SPME.	141
Figura IV-6. Barra agitadora de extracción.	142
Figura IV-7. Disco laminar de extracción en fase sólida.	146
Figura IV-8. Recuperación analítica media obtenida con distintos tiempos de secado del disco de SPE.	149
Figura IV-9. Recuperaciones (%) obtenidas con los distintos disolventes de elución del disco de SPE.	150
Figura IV-10. Rotavapor.	153
Figura IV-11. Sistema Visiprep con accesorio desecante Visidry.	154
Figura IV-12. Recuperación analítica (%) obtenidos con los distintos sistemas de evaporación (n=3).	156
Figura IV-13. Recuperación analítica (%) obtenida con los distintos porcentajes de metanol (n=2) en la extracción SPE.	158
Figura IV-14. Adsorción de los pesticidas a las paredes de los recipientes al añadir un 20% de MeOH después de sobrecargar con el patrón (A) o antes de la sobrecarga (B).	160
Figura IV-15. Variación de la recuperación analítica (%) con la cantidad de materia orgánica de la muestra (mg KMnO ₄ /L).	161
Figura IV-16. Recuperaciones analíticas (%) con porcentajes diferentes de MeOH en agua de abastecimiento y comparación con agua Milli-Q.	162
Figura IV-17. Porcentaje de los pesticidas adsorbidos por los filtros.	164
Figura IV-18. Esquema del proceso desarrollado para la extracción de pesticidas organoclorados en aguas empleando discos SPE laminares.	166
Figura IV-19. Cromatograma obtenido tras la inyección PSS-GC-ECD de un extracto de lixiviado.	170
Figura IV-20. Esquema del proceso de microextracción líquido-líquido propuesto.	172

Figura IV-21. Cromatograma obtenido al procesar una muestra de agua Milli-Q sobrecargada a un nivel de 0.03 µg/L y analizada con el método propuesto de microextracción líquido-líquido (LVOCI-GC-ECD).	175
Figura IV-22. Cromatogramas correspondientes a una muestra de agua de grifo (A), y agua de arroyo (B) analizadas según el método de microextracción líquido-líquido propuesto (LVOCI-GC-ECD).	177
Figura V-1. Bandeja agitadora, sonda de ultrasonidos y baño de ultrasonidos.	194
Figura V-2. Esquema de un Soxhlet.	196
Figura V-3. Extractor Soxtec (A) y batería de Soxhlet automatizada (B).	198
Figura V-4. Calentamiento por conducción (A) y por energía de microondas (B).	199
Figura V-5. Esquema de un sistema de radiación de microondas focalizadas con reactores abiertos.	200
Figura V-6. Esquema y fotografía de un equipo de extracción con líquidos a presión.	206
Figura V-7. Celda de extracción donde se introduce la muestra.	206
Figura V-8. Resultados obtenidos en los ensayos de extracción mediante agitación para una concentración de 500 µg/g de pesticidas en suelos. B: ensayos en bandeja agitadora. US: ensayos en baño de ultrasonidos.	216
Figura V-9. Esquema del proceso de extracción en baño de ultrasonidos.	217
Figura V-10. Esquema y fotografía de un reactor de microondas modelo MF 100 (Anton Paar) y de un rotor.	219
Figura V-11. Recuperaciones analíticas (%) obtenidas en los ensayos de elución.	221
Figura V-12. Programas de potencia de radiación de microondas ensayados.	222
Figura V-13. Recuperaciones obtenidas con cada método ensayado. 1,2 y 3: programas de la figura V-12. A: hexano:acetona (1:1), B: hexano:acetato de etilo (1:1).	223
Figura V-14. Temperaturas alcanzadas con cada programa ensayado.	226
Figura V-15. Esquema del proceso de extracción empleando energía de microondas.	228
Figura V-16. Blanco de celda de extracción PLE inyectado en <i>splitless</i> -GC-ECD.	232
Figura V-17. Cromatograma obtenido al inyectar el blanco de celda de extracción en PSS-GC-MS en modo <i>full</i> .	233
Figura V-18. Blanco de disolventes inyectado en <i>splitless</i> -GC-ECD.	234

Figura V-19. Cromatograma obtenido después de lavar la celda antes de la extracción.	234
Figura V-20. Efecto de la temperatura del horno sobre la recuperación analítica en la extracción mediante PLE (n=3).	237
Figura V-21. Cromatogramas obtenidos al extraer una muestra de suelo mediante PLE con temperaturas del horno de 65°C, 100°C y 150°C.	238
Figura V-22. Efecto de la presión sobre las recuperaciones analíticas en la extracción mediante PLE (n=3).	240
Figura V-23. Efecto del tiempo de extracción estática sobre las recuperaciones analíticas en la extracción mediante PLE (n=3).	241
Figura V-24. Efecto del volumen de disolvente sobre las recuperaciones analíticas en la extracción mediante PLE (n=3).	242
Figura V-25. Esquema del proceso de análisis empleando PLE.	243
Figura V-26. Dispositivos comerciales para la purificación colocados en un sistema distribuidor de vacío Visiprep.	248
Figura V-27. Extractos obtenidos después de purificar con distintos adsorbentes. A: sin purificar. B: purificación con carbón. C: purificación con los demás adsorbentes.	253
Figura V-28. Cromatogramas obtenidos al inyectar en <i>splitless</i> -GC-ECD un patrón de 0.1 µg/mL (arriba) y un extracto de suelo sin purificar.	254
Figura V-29. Cromatogramas obtenidos al inyectar en <i>splitless</i> -GC-ECD los extractos de suelo purificados (ensayos 2 y 3, según tabla V-10).	255
Figura V-30. Cromatogramas obtenidos al inyectar en <i>splitless</i> -GC-ECD los extractos de suelo purificados (ensayos 8, 10 y 12, según tabla V-10)	256
Figura V-31. Cromatogramas obtenidos al inyectar los extractos purificados en PSS-GC-ITMS(continúa) (ensayo según tabla V-10).	258
Figura V-32. Resultados obtenidos al analizar un material de referencia certificado de pesticidas en suelos con los métodos de extracción estudiados.	265
Figura V-33. Cromatograma obtenido en las condiciones seleccionadas para separar los pesticidas que aparecen en los materiales de referencia certificados (GC-ECD, DB-35MS).	268
Figura V-34. Análisis del material certificado SRM 1941b (n=3).	269
Figura V-35. Resultados obtenidos al analizar el material SRM 1944 (n=3).	270
Figura V-36. Resultados obtenidos al analizar el material SRM 1649 a (n=3).	271

Figura VI-1. Área afectada por la contaminación de residuos de HCH.	288
Figura VI-2. Composición porcentual del residuo de fabricación de Lindano.	290
Figura VI-3. Localización en la parcela de estudio de los puntos de muestreo.	291
Figura VI-4. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C1.	295
Figura VI-5. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C2.	296
Figura VI-6. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C3.	297
Figura VI-7. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C4.	298
Figura VI-8. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C5.	299
Figura VI-9. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C6.	299
Figura VI-10. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C7.	300
Figura VI-11. Niveles de los isómeros de HCH en el punto C8.	301
Figura VI-12. Localización de los puntos de muestreo y concentración total de isómeros obtenida en cada punto	302
Figura VI-13. Distribución porcentual de cada isómero de HCH en cada punto de muestreo.	303
Figura VI-14. Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de suelo por PSS-GC-MS en modo <i>full</i> .	305
Figura VI-15. Cromatograma obtenido al inyectar un extracto de lixiviado por PSS-GC-MS (m/z : 181).	307
Figura VI-16. Mapa de localización de los puntos de muestreo de aguas.	308
Figura VI-17. Cromatograma obtenido al inyectar la muestra L2 por PSS-GC-MS en modo <i>full</i> .	310

Tabla I-1. Solubilidad en agua (g/L), presión de vapor (Pa) a 20-25°C, coeficiente de adsorción al suelo K_{oc} (cm ³ /g).	12
Tabla I-2. LD ₅₀ en ratas (mg/kg) y carcinogeneidad según criterio de la US EPA.	13
Tabla I-3. Concentraciones óptimas y de intervención en suelo y aguas subterráneas establecidos en la lista holandesa.	21
Tabla III-1. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de la separación con la columna Quadrex 007-608.	50
Tabla III-2. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de la separación con la columna HP-5.	52
Tabla III-3. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de la separación con la columna DB-35 MS.	54
Tabla III-4. Condiciones cromatográficas con las cuales se obtuvo el cromatograma de la figura III-8 con la columna DB-XLB.	56
Tabla III-5. Condiciones seleccionadas para la inyección <i>split/splitless</i> .	60
Tabla III-6. Límites de detección (LD), cuantificación (LC) y rango lineal (µg/L) para la inyección <i>splitless</i> -GC-ECD.	61
Tabla III-7. Repetibilidad (A) y Reproducibilidad (B) expresadas en desviación estándar relativa (%) de la inyección <i>splitless</i> -GC-ECD.	62
Tabla III-8. Condiciones de trabajo GC-MS modo SIM.	63
Tabla III-9. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño experimental para la inyección PSS-GC-MS.	65
Tabla III-10. Matriz del diseño experimental para la inyección PSS-GC-MS.	65
Tabla III-11. Efectos estimados para γ -HCH y β -endosulfán (PSS-GC-MS).	67
Tabla III-12. Tabla del diseño composicional centrado para la optimización del inyector PSS-GC-MS.	70
Tabla III-13. Valores óptimos del flujo de <i>split</i> (mL/min) y tiempo de transferencia (min) para cada compuesto en la inyección PSS-GC-MS.	72
Tabla III-14. Condiciones seleccionadas para la inyección PSS-GC-MS.	73
Tabla III-15. Límites de detección y cuantificación (µg/L) para la inyección PSS-GC-MS (20 µL) y <i>splitless</i> -GC-MS (1 µL).	74
Tabla III-16. Precisión expresada como desviación estándar relativa (DER) para la inyección PSS-GC-MS (n=8).	75
Tabla III-17. Relación entre las variables estudiadas en el sistema PSS-GC-ECD.	77
Tabla III-18. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño para la inyección PSS-GC-ECD.	78
Tabla III-19. Matriz del diseño experimental para la inyección PSS-GC-ECD.	79
Tabla III-20. Efectos estimados para endrín y p,p'-DDT (PSS-GC-ECD).	81
Tabla III-21. Tabla del diseño composicional centrado para la optimización del inyector PSS-GC-ECD.	82

Tabla III-22. Valores óptimos del flujo de <i>split</i> 1 (mL/min), tiempo de transferencia (min) y velocidad de rampa del inyector (°C/min) para cada compuesto en la inyección PSS-GC-ECD.	84
Tabla III-23. Condiciones seleccionadas para la inyección PSS-GC-ECD.	85
Tabla III-24. Límites de detección y cuantificación (µg/L) para la inyección PSS-GC-ECD (20 µL) y <i>splitless</i> -GC-ECD (1 µL).	86
Tabla III-25. Precisión expresada como desviación estándar relativa (DER) para la inyección PSS-GC-ECD (n=4).	87
Tabla III-26. Condiciones en las que se ha obtenido el cromatograma de la figura III-18.	90
Tabla III-27. Condiciones cromatográficas del ensayo 1 (LVOCI-GC-ECD).	91
Tabla III-28. Condiciones cromatográficas del ensayo 2 (LVOCI-GC-ECD).	92
Tabla III-29. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño experimental 1 para el sistema LVOCI-GC-ECD.	96
Tabla III-30. Matriz del diseño experimental 1 (LVOCI-GC-ECD).	97
Tabla III-31. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño experimental 2 para el sistema LVOCI-GC-ECD.	98
Tabla III-32. Matriz del diseño experimental 2 (LVOCI-GC-ECD).	98
Tabla III-33. Efectos estimados de orden 1 para γ -HCH, γ + α -clordano y endosulfán sulfato (LVOCI-GC-ECD).	102
Tabla III-34. Condiciones seleccionadas para la inyección LVOC-GC-ECD.	108
Tabla III-35. Límites de detección (LD), cuantificación (LC) y rango lineal (µg/L) para la inyección <i>on-column</i> de grandes volúmenes (100 µL).	110
Tabla III-36. Repetibilidad (A) (n=11) y reproducibilidad (B) (n=6) expresadas como desviación estándar relativa (%) para LVOCI.	111
Tabla III-37. Límites de detección en µg/L y repetibilidad (% DER) para la inyección <i>split/splitless</i> (1 µL), la inyección PSS (20 µL) y LVOCI (100 µL).	112
Tabla III-38. Degradación (%) de endrín y p,p'-DDT con los sistemas de inyección estudiados (GC-ECD).	115
Tabla IV-1. Ejemplos de aplicación de SPE para la extracción de pesticidas organoclorados (OCP) en aguas.	139
Tabla IV-2. Parámetros físico-químicos de las muestras de agua estudiadas.	161

Tabla IV-3. Recuperaciones analíticas (%) y desviaciones estándar relativas (%) obtenidas en este trabajo (A), en el método EPA 508.1 (B) y por otros autores (C-F) a distintos niveles de concentración.	167
Tabla IV-4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos con el método de extracción SPE propuesto.	169
Tabla IV-5. Recuperaciones analíticas y desviaciones estándar relativas (DER) del proceso de microextracción líquido-líquido propuesto.	174
Tabla IV-6. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos con el método de microextracción líquido-líquido LVOCI-GC-ECD propuesto.	176
Tabla V-1. Condiciones empleadas en el análisis de pesticidas organoclorados en muestras sólidas mediante energía de microondas. En el caso de analizarse más compuestos, las recuperaciones (%R) son las correspondientes a los organoclorados.	203
Tabla V-2. Ejemplos de condiciones empleadas en el análisis de pesticidas organoclorados en muestra sólidas mediante PLE.	210
Tabla V-3. Recuperaciones analíticas (%) obtenidas en la extracción mediante agitación con ultrasonidos para una concentración de 6.25 µg/g (n=2).	218
Tabla V-4. Recuperaciones analíticas (%) obtenidas con los 3 programas de potencia ensayados para las mezclas de disolventes A (hexano:acetona 1:1) y B (hexano:acetato de etilo 1:1). (n=2).	225
Tabla V-5. Recuperaciones analíticas (%) y desviaciones estándar (DE) obtenidas con el método propuesto A (n=5) y por otros autores (B,C y D).	230
Tabla V-6. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) (ng/g) obtenidos mediante la extracción con energía de microondas y determinación <i>splitless</i> -GC-ECD.	231
Tabla V-7. Recuperaciones analíticas (%) y desviaciones estándar relativas (DER %) obtenidas en este trabajo (A) y por otros autores (B-D).	245
Tabla V-8. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) (ng/g) obtenidos con el método de extracción mediante PLE propuesto y determinación <i>splitless</i> -GC-ECD.	246
Tabla V-9. Ejemplos de las condiciones utilizadas en la etapa de purificación en el análisis de pesticidas en suelos y frutas y vegetales. H:hexano; DCM: diclorometano; A:acetona; DE: dietileter; EP: eter de petroleo	250
Tabla V-10. Ensayos de purificación realizados. H: hexano, AE: acetato de etilo, DCM: diclorometano.	252
Tabla V-11. Recuperaciones analíticas (%) y desviaciones estándar relativas (DER %) del proceso de purificación seleccionado.	261
Tabla V-12. Comparación entre los sistemas de extracción.	263
Tabla VI-1. Muestras de suelo de la parcela estudiada.	293

Tabla VI-2. Concentración de cada isómero y suma de isómeros de HCH (mg/kg suelo seco) en las muestras analizadas.	294
Tabla VI-3. Concentración de otros pesticidas organoclorados (µg/g) en las muestras seleccionadas.	304
Tabla VI-4. Concentraciones de HCH (µg/L) en los lixiviados recogidos.	306

AE: Acetato de etilo

ASE: Extracción acelerada con disolventes, *Accelerated Solvent Extraction*

BCR: *Community Bureau of Reference of European Commission*

BOE: Boletín oficial del estado

COP: Compuestos orgánicos persistentes

DAME: Extracción dinámica asistida por microondas, *Dynamic Assisted Microwave Extraction*

DCBF: Decaclorobifenilo

DCM: Diclorometano

DDD: 2,2-bis(clorofenil)1,1-dicloroetano

DDE: 2,2-bis(clorofenil)1,1-dicloroetilen

DDT: diclorofeniltricloroetano

DER: Desviación estándar relativa

DOCE: Diario oficial de la Comunidad Europea

DOGA: Diario oficial de Galicia

DVB: Divinilbenceno

ECD: Detector de captura de electrones, *Electron Capture Detector*

EPA: Agencia de Protección del Medioambiente (EEUU), *Environmental Protection Agency*

ESE: Extracción potenciada con disolventes, *Enhanced Solvent Extraction*

FMASE: Extracción Soxhlet asistida por microondas focalizadas, *Focused Microwave Accelerated Solvent Extraction*

GC: Cromatografía de gases

GCB: Negro de carbón grafitizado, *Graphitized Carbon Black*

IME: Extracción microondas integrada, *Integrated Microwave Extraction*

ITMS: Espectrometría de masas con trampa iónica, *Ion Trap Mass Spectrometry*

H: Hexano

HCH: Hexaclorociclohexano

HSSPME: Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza, *Headspace solid-phase Microextraction*

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución,

K_{OC}: Coeficiente de adsorción

LC: Límites de cuantificación

LD: Límites de detección

LD₅₀: Dosis letal 50

LLE: Extracción líquido-líquido, *Liquid Liquid Extraction*

LRM: Límites máximos de residuos

LVOCI: Inyección *on-column* de gran volumen, *Large Volume On-Column Injection*

MAE: Extracción asistida por energía de microondas, *Microwave Assisted Extraction*

MA-HS-SPME: Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza asistida por energía de microondas, *Microwave assisted Headspace solid-phase microextraction*

MS: Espectrometría de masas

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

OCP: Pesticidas organoclorados, *Organochloride Pesticides*

P & T: Purga y atrapamiento, *Purge and Trap*

PAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, *Polycyclic Aromatic Hidrocarbons*

PCBs: Policlorobifenilos

PDMS: Polidimetilsiloxano

PFE: Extracción con fluidos a presión, *Pressurized Fluid Extraction*

PLE: Extracción con líquidos a presión, *Pressurized Liquid Extraction*

PPC: Control neumático programado, *Programmed Pneumatic Control*

PSE: Extracción con disolventes a presión, *Pressurized Solvent Extraction*

PSS: *split/splitless* programada, *Programmed split/splitless*

PTFE: Politetrafluoroetileno

PTV: Vaporización con temperatura programada, *Programmed Temperature Vaporization*

RRF: Factor de respuesta relativo, *Relative response factor*

SBSE: Extracción con barra agitadora, *Stir Bar Sorptive Extraction*

SBWE: Extracción con agua subcrítica, *Subcritical Water Extraction*

SFE: Extracción con fluidos supercríticos, *Supercritical Fluid Extraction*

SIM: Monitorización de iones seleccionados, *Selected Ion Monitoring*

SME: Microextracción con disolventes, *Solvent Microextraction*

SPE: Extracción en fase sólida, *Solid-Phase Extraction*

SPME: Microextracción en fase sólida, *Solid-Phase Microextraction*

SVE: Salida del vapor de disolvente, *Solvent Vapour Exit*

TCMX: 2,4,5,6-tetracloro-*m*-xileno

TLC: Cromatografía en capa fina, *Thin Layer Chromatography*

T_R: Tiempo de retención, *Retention Time*

Uma: Unidad de masa atómica

US: Ultrasonidos

USEPA: Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU, *US Environmental Protection Agency*

UTM: Tiempo Universal, *Universal Time Meridian*

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. LOS PESTICIDAS EN EL MEDIOAMBIENTE	5
1.1. Antecedentes históricos	5
1.2. Episodios de contaminación por pesticidas organoclorados	6
1.3. Efectos medioambientales	8
2. CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y TOXICOLOGÍA	11
2.1. DDT y análogos	13
2.2. Isómeros de hexaclorociclohexano	15
2.3. Derivados de ciclodieno	16
3. LEGISLACIÓN	18
3.1. Aguas	19
3.2. Suelos	20
3.3. Otras matrices	21
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. LOS PESTICIDAS EN EL MEDIOAMBIENTE

1.1. Antecedentes históricos

Los plaguicidas son productos químicos destinados a luchar contra los parásitos, tanto animales como vegetales, que constituyen las plagas en general. Si actúan contra determinadas plagas en agricultura se les llama pesticidas, que a su vez pueden ser insecticidas si se utilizan contra plagas de insectos, funguicidas si se utilizan contra hongos, bactericidas contra bacterias, herbicidas, etc. [Álvarez-Campana, 2001].

El empleo a gran escala de los pesticidas comienza en 1942, cuando se patentó el DDT (diclorodifeniltricloroetano), que fue ampliamente utilizado durante dos décadas. En el periodo de 1945-1955 se desarrollan la mayoría de los pesticidas organofosforados, carbamatos y fenilureas, muchos de los cuales aún se emplean hoy en día. En los siguientes cinco años se introducen las triazinas y posteriormente se desarrollaron diversos fungicidas [Barceló y Hennion, 1997].

La utilización de pesticidas condujo a un notable incremento en el rendimiento de las cosechas y a una disminución de la incidencia de enfermedades propagadas por los insectos. Sin embargo su presencia en el medioambiente se vio incrementada de forma notable, causando problemas de contaminación debido a su toxicidad y escasa biodegradabilidad [Pardo y Marañón, 1997].

En la década de los 60 comienzan a aparecer efectos ecotoxicológicos debidos al empleo intensivo de DDT y otros pesticidas organoclorados persistentes, lo que llevó a su prohibición (el DDT se prohibió en 1972 en USA) o a una severa restricción en su uso, siendo gradualmente sustituidos en los países desarrollados por otros plaguicidas menos contaminantes. A pesar de los efectos nocivos descubiertos, algunos países en vías de desarrollo todavía emplean hoy en día pesticidas organoclorados en la agricultura y para higiene pública, debido a su bajo coste y a su versatilidad en el control de plagas, como sucede en el caso del DDT a consecuencia de su rápido y espectacular éxito en la erradicación de la malaria [Fatoki y Awofolu, 2003].

El 23 de mayo de 2001 la Convención de las Naciones Unidas sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) aprobó en Estocolmo la eliminación total de la llamada “docena sucia” con el apoyo de 90 países entre los cuales se encuentra España. Este Convenio entró en vigor el 17 de mayo de 2004 y fue ratificado por España el 18 de mayo de 2004 (BOE nº 151 de 23 de junio de 2004). Bajo el nombre de “docena sucia” se agrupan los 12 contaminantes orgánicos persistentes que han sido seleccionados, a partir de la evidencia científica existente, para ser blanco de acción internacional inmediata con el fin de reducir o eliminar su descarga al ambiente y proteger de su exposición a los seres humanos, fauna silvestre y ecosistemas. Los 12 contaminantes, de los cuales 6 se analizan en este trabajo, son los siguientes: DDT, aldrín, clordano, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno, PCBs, dioxinas y furanos [Albornoz, 2003].

Asimismo la mayoría de los pesticidas incluidos en el presente trabajo se encuentran incluidos en la lista TCL (Lista de compuestos diana, *Target Compound List*) de la USEPA (Agencia de Protección de Medioambiente de los Estados Unidos), que es una lista derivada de la Lista de Contaminantes Prioritarios de la USEPA, y en la lista de compuestos orgánicos persistentes de la Comisión Económica para Europa de la Organización de las Naciones Unidas (UN/ECE/1999).

1.2. Episodios de contaminación por pesticidas organoclorados

Además de la contaminación derivada de la aplicación de pesticidas en los cultivos, en ocasiones se han producido episodios graves de contaminación provocados por la industria dedicada a la fabricación de los mismos.

En 1977, se encontró en el norte de Carolina (Estados Unidos) una zona de unos 9 acres que presentaba contaminación por conservantes de madera que contenían lindano [Earthfax, 2002]. Otro caso se produjo en 1982, cuando se iniciaron los estudios de descontaminación de 7770 hectáreas de suelo contaminado por productos procedentes de la fabricación de pesticidas en el

arsenal militar de Rocky Mountain en Denver (Colorado, USA) [Álvarez-Campana, 2001].

En 1998 se encontraron en Bangladesh grandes cantidades de DDT abandonadas en una antigua factoría [Jayaraman, 1998].

En Europa también se han detectado casos de contaminación por pesticidas. En el verano de 1996 las autoridades italianas y suizas detectaron contaminación por DDT en el lago Maggiore (Italia) [Guardo y Calamari, 2000-2002].

De igual forma España también se ha visto afectada por este tipo de situaciones. Así en Barakaldo [IHOBE, 2001] una fábrica de lindano (HCH) en funcionamiento hasta 1987, provocó vertidos, en 35 puntos diferentes, de un total de 80000 toneladas de residuos y unas 4500 toneladas de lindano puro. Una fábrica de pesticidas situada en un polígono industrial de la provincia de Huesca originó un episodio de contaminación por DDT y derivados, debido a los vertidos realizados a un río próximo, que afectó a la fauna de la zona [Serrano, 2000]. En la misma provincia una fábrica de lindano llevó a cabo vertidos irregulares de residuos del mismo provocando la contaminación del río Gállego [Domínguez, 1997].

También en Galicia, los depósitos procedentes de la fabricación de lindano, que se producía desde 1947 en el polígono industrial de Torneiros (Porriño, Pontevedra), han provocado la contaminación de la zona en la cual se situaba la fábrica y donde se depositaban los residuos, alcanzando la superficie afectada unos 45000 m². Asimismo se contaminaron los acuíferos de la zona [Martínez-Lozano y González-Rodríguez, 1999] [Xunta, 1999] y se han producido situaciones de alarma social, al percibirse el olor a insecticida en un colegio y un polígono de viviendas próximos a la zona afectada. Algunas muestras de suelo y aguas procedentes de estos terrenos fueron analizadas en el presente trabajo (capítulo VI).

1.3. Efectos medioambientales

La principal fuente de origen de los pesticidas es la agricultura, aunque en los últimos años destacan también otros usos no agrícolas de los mismos, como son el mantenimiento de las autopistas y los campos de golf.

A pesar de que los pesticidas son aplicados en las prácticas agropecuarias para combatir las distintas plagas que afectan a los cultivos, sólo una pequeña cantidad de las sustancias aportadas al terreno ejerce su acción y tras su aplicación sobre el cultivo, los pesticidas pueden encontrar diversos destinos. Algunos de ellos pueden pasar a la atmósfera por volatilización y recorrer largas distancias desde su lugar de aplicación o bien descomponerse como consecuencia de la luz solar. Otros llegan a las aguas superficiales (ríos, lagos, mares) debido a escorrentías superficiales, drenajes y erosiones (figura I-1).

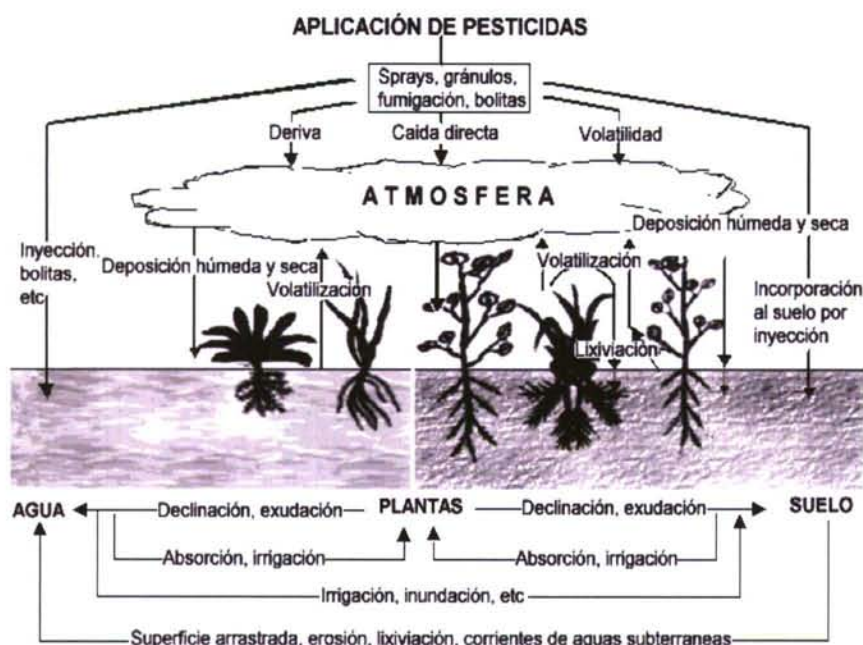


Figura I-1. Posible distribución y destino de pesticidas agrícolas y sus productos de degradación en la biosfera [Novotny y Olem, 1994].

Una vez penetran en los suelos, los pesticidas pueden sufrir procesos de degradación (físico-química o microbiológica), acumulación (absorción y adsorción) o transporte (difusión, lixiviación y volatilización).

Los plaguicidas quedan retenidos en el suelo al adsorberse sobre las arcillas y la materia orgánica en mayor o menor grado dependiendo de su coeficiente de adsorción (K_{oc}), siendo menos retenidos cuanto menor es dicho coeficiente [García y Dorronsoro, 2003]. Los mecanismos mediante los cuales se produce esta adsorción son:

- Cambio iónico, que tiene lugar para pesticidas catiónicos.
- Formación de enlaces por puentes de hidrógeno o puentes de agua, que se produce en el caso de compuestos polares no iónicos que se adsorben a los minerales arcillosos y a la materia orgánica. Este mecanismo depende del pH del suelo.
- Cambio de ligando, en el cual el pesticida actúa como agente quelatante fuerte, reemplazando uno o más ligandos en los complejos entre iones metálicos y el suelo.
- Enlace por transferencia de carga, que se produce cuando existe una transferencia de electrones entre un dador rico en electrones, como son muchos plaguicidas, y un aceptor deficiente en electrones, como los que existen en la materia orgánica.
- Fuerzas de Van der Waals, que tiene lugar entre moléculas grandes apolares y las partículas minerales.
- Interacciones hidrofóbicas, que tienen lugar en compuestos de baja solubilidad en agua como los plaguicidas no polares (entre los que se incluyen los organoclorados) o los PCBs.

La mayoría de los pesticidas organoclorados persisten en los suelos durante meses e incluso años y esta persistencia es aún mayor en el caso de suelos arcillosos o con alto contenido en materia orgánica, como consecuencia de los procesos que se acaban de comentar. Hay pocas evidencias de que exista un efecto a largo plazo sobre los hongos y las bacterias del suelo cuando los pesticidas son aplicados en concentraciones normales, sin embargo sí parecen existir

perturbaciones temporales en el equilibrio existente entre las distintas especies de micro-artrópodos del suelo [Hassall, 1990].

Dentro de los procesos de transporte que pueden sufrir los pesticidas, la lixiviación es el más importante debido a las consecuencias que puede tener, ya que arrastrados por las aguas los pesticidas pueden filtrarse hacia las aguas subterráneas (embalses subterráneos y acuíferos), que constituyen la principal fuente de agua potable y la de más fácil aprovechamiento [Águeda, 1997], pudiendo, por tanto, afectar al hombre.

Aunque las aguas de los drenajes de terrenos de cultivo suelen estar libres de pesticidas debido a su alta adsorción sobre las partículas de suelo, en ocasiones pueden encontrarse en las aguas valores elevados de pesticidas debidos a efluentes de fábricas, desinfección de animales o escorrentías agrícolas. La cantidad de pesticidas presentes en el agua depende en gran medida de la intensidad de producción agrícola en una región dada, del tipo de pesticidas aplicados, tipo de cultivo, estación del año, precipitaciones y velocidad de las corrientes de agua. Por último, también hay que tener en cuenta que la precipitación de los pesticidas transportados por la atmósfera puede producir la contaminación de acuíferos situados muy lejos de las áreas agrícolas [Biziuk y cols., 1996].

El principal problema de estos episodios de contaminación es que los tratamientos de aguas convencionales no eliminan los pesticidas solubles, por lo cual pueden afectar a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano [Vassilakis y cols., 1998].

Asimismo desde el suelo los pesticidas pueden pasar a las plantas donde se acumulan o, en ocasiones, son degradados. Si estas plantas son comestibles los pesticidas entran a formar parte de la cadena trófica llegando al hombre [Singh, 2001]. La entrada de los pesticidas en las plantas puede producirse a través de las raíces, incluso en el caso de sustancias poco solubles, y desde allí trasladarse y acumularse en las partes aéreas de las mismas.

Los pesticidas organoclorados se han encontrado en aire [Alegria y cols., 2000], aguas [Rico y cols., 1989], suelos [Oliva-Ortiz y cols., 2002], sedimentos

[Silgoner y cols., 1998], alimentos [Dejonckheere y cols., 1996], mejillones, animales salvajes [Ólafsdóttir y cols., 1995], leche materna [Dogheim y cols., 1996], tejidos humanos [López y cols., 2001], etc., lo que demuestra su amplia distribución en los distintos compartimentos ambientales.

2. CARACTERÍSTICAS, PROPIEDADES Y TOXICOLOGÍA

Según su estructura los pesticidas organoclorados se clasifican en 3 familias: DDT y análogos, isómeros del hexaclorociclohexano y derivados del ciclodieno, y todos ellos tienen en común la presencia de al menos un anillo carbonado clorado. La estabilidad térmica de la mayoría es elevada debido a que están constituidos por enlaces C-C, C-H y C-Cl, que tienden a ser bastante inactivos en condiciones medioambientales normales. Otra característica común de gran importancia es su baja solubilidad en agua. Esto, unido a su fuerte carácter lipofílico, hace que tiendan a acumularse en los lípidos produciéndose una bioacumulación. Debido a esta propiedad, los pesticidas organoclorados pueden alcanzar concentraciones elevadas en depredadores, que se encuentran en la cima de la cadena alimenticia. Este fenómeno se denomina biomagnificación (figura I-2).

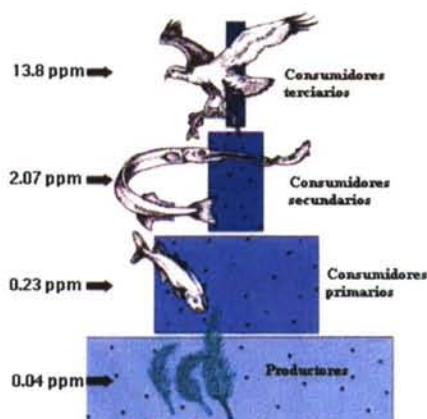


Figura I-2. Ejemplo de biomagnificación en la cadena alimenticia (los números son valores representativos de la concentración de DDT y sus derivados en los tejidos [Kimball's-Biology-Pages, 2001]).

La mayoría de los pesticidas organoclorados son sólidos a temperatura ambiente y en general sus presiones de vapor son bajas [Hassall, 1990]. En la tabla I-1 se muestran propiedades físico-químicas de algunos de los pesticidas estudiados.

Tabla I-1. Solubilidad en agua (g/L), presión de vapor (Pa) a 20-25°C, coeficiente de adsorción al suelo K_{oc} (cm³/g).

Pesticida organoclorado	Solubilidad	Presión de vapor	K_{oc}
Aldrín	2.7 10 ⁻⁵	3.6 10 ⁻²	5000
Clordano	0.1 10 ⁻³	1.3 10 ³	-
DDT	Insoluble	2.5 10 ⁻⁵	-
Dieldrín	0.2 10 ⁻³	-	-
Endosulfán	0.32 10 ⁻³	8.3 10 ⁻⁴	12400
Endrín	0.23 10 ⁻³	-	10000
Heptacloro	6 10 ⁻⁵	0.053	-
Lindano	7.3 10 ⁻³	5.6 10 ⁻³	1100
Metoxicloro	0.1 10 ⁻³	Muy baja	80000

Muchos de ellos debilitan el sistema inmunológico y son sospechosos de causar enfermedades como el cáncer, pues han sido relacionados con el cáncer de hígado y de pecho, con tumores testiculares y también son causantes de la reducción del número de espermatozoides en humanos [Davis y Bradlow, 1995]. Además clordano, DDT y metabolitos, dieldrín, endosulfán, lindano, heptacloro y metoxicloro están incluidos en la lista de “disruptores endocrinos”, sustancias declaradas o sospechosas de causar alteraciones endocrinas [Canada's-Parliament, 2000].

En la tabla I-2 se presentan los valores de toxicidad oral aguda en ratas (expresadas como dosis letal 50, LD₅₀), y de carcinogenicidad de algunos pesticidas.

Tabla I-2. LD₅₀ en ratas (mg/kg) y carcinogenicidad según criterio de la USEPA.

Pesticida	LD ₅₀	Carcinogenicidad
Aldrín	39	Probable
Clordano		Probable
DDD	>5 g/kg	Cancerígeno
DDE	880	Cancerígeno
DDT	87	Cancerígeno
Dieldrín	38	Probable
α-Endosulfán	76	
β-Endosulfán	240	
Endosulfán sulfato	18	
Endrín	7	No clasificado
Endrín cetona		Sospechoso
α-HCH	177	Cancerígeno
β-HCH	6	Cancerígeno
δ-HCH		No clasificado
γ-HCH	76	Probable
Heptacloro	40	Probable
Isodrín	7	
Metoxicloro	1855	No clasificado

Además de las propiedades comunes a la mayoría de los pesticidas organoclorados, los compuestos de una misma familia tienen características físico-químicas comunes. A continuación se presentan las principales características de los pesticidas organoclorados agrupados por familias.

2.1. DDT y análogos

Este grupo incluye a los isómeros de DDT (diclorodifeniltricloroetano), DDE (2,2-bis(clorofenil)1,1-dicloroetileno) y DDD (2,2-bis(clorofenil)-1,1-dicloroetano), al metoxicloro (2,2-bis(metoxifenil)-1,1,1-tricloroetano), al dicofol (2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil) etanol) y el clorobenzilato (etil 4-cloro-alfa-(4-clorofenil)-alfa-hidroxi-bencenacetato).

La mezcla técnica del DDT es un sólido blanco ceroso y con un característico olor empalagoso. El isómero *p,p'*-DDT puro tiene una presión de vapor de $3 \cdot 10^{-7}$ mmHg a 25°C, y su temperatura de ebullición es de 110°C. Es muy insoluble en agua y moderadamente soluble en muchos disolventes orgánicos (incluyendo los aceites naturales y los lípidos), resistente a la luz, al oxígeno y a los ácidos inorgánicos fuertes. Este compuesto está clasificado por la USEPA como carcinogénico y además ataca al sistema nervioso central, al sistema reproductor y al hígado.

El DDD y el DDE aparecen generalmente como consecuencia de la degradación del DDT, y se han encontrado frecuentemente en el tejido adiposo humano [Hassall, 1990].

Las tres principales rutas de degradación del DDT son las que se pueden ver en la figura I-3.

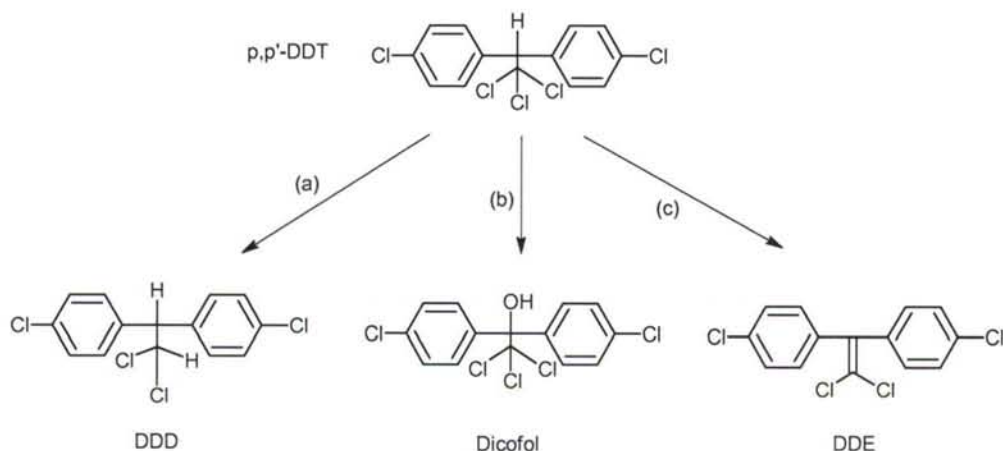


Figura I-3. Metabolismo del DDT. (a) Eliminación reductora de cloro, producida por un mecanismo anaerobio en el hígado, por bacterias sobre tejidos muertos o por algunos microorganismos. (b) Oxidación, producida por algunos insectos. (c) Deshidrocloración producida por la mayoría de los insectos, aves y mamíferos [Hassall, 1990].

Por último indicar que el **p,p'-DDE** es más volátil que el p,p'-DDT por lo que se elimina más fácilmente de las áreas sobre las que se aplica, aunque a su vez esta característica aumenta la posibilidad de contaminar otras zonas como consecuencia del transporte.

El **metoxicloro** tiene menor tendencia que el DDT a acumularse en los tejidos adiposos animales, siendo también menores su toxicidad oral aguda y su eficacia como insecticida.

2.2. Isómeros de hexaclorociclohexano

La molécula de hexaclorociclohexano (HCH) (figura I-4) tiene 8 posibles isómeros dependiendo de la posición de los átomos de cloro. De todos ellos, el isómero γ (llamado lindano) es el biológicamente más activo, mientras que los isómeros α y δ son mucho menos tóxicos, y los isómeros β y ϵ son casi inertes. La mezcla técnica contiene un 13% del isómero γ , 68% de α y pequeñas cantidades de β y δ .

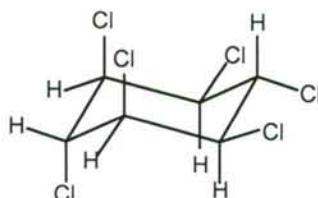


Figura I-4. Lindano (γ -HCH).

El lindano puro es un sólido blanco casi inodoro, poco soluble en agua, moderadamente soluble en keroseno y muy soluble en acetona. Su presión de vapor es aproximadamente 10^{-5} mmHg a 20°C y es estable a la luz y al calor. La exposición excesiva puede afectar al hígado, sistema nervioso, riñón, sistema reproductor y posiblemente al sistema inmunológico [Matolcsy y cols., 1988].

2.3. Derivados de ciclodieno

Estos compuestos se forman por la reacción entre un dieno y un dienófilo, en lo que se llama reacción de Diels-Alder. La estructura química de los insecticidas ciclodiénicos es compleja porque la molécula no es plana. Las estructuras de algunos derivados del ciclodieno pueden verse en la figura I-5.

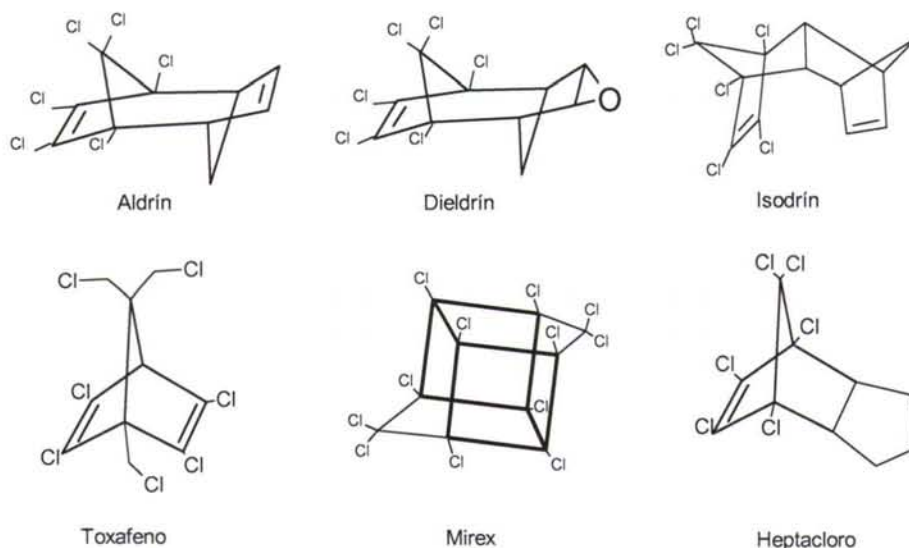


Figura I-5. Algunos derivados de ciclodieno.

La eficacia de los insecticidas del tipo ciclodieno depende en gran medida de su estructura específica. Su estructura estérica también es muy importante desde el punto de vista de la actividad [Hassall, 1990].

El **aldrín** (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4',5,8,8'-hexahidro-exo-1,4-endo-5,8-dimetanonaftaleno) es muy estable frente a ácidos y bases orgánicos e inorgánicos del suelo. Una vez presentes en el mismo, o en plantas, insectos y organismos de sangre caliente, se transforma en su epóxido el **dieldrín** (6,7-epoxi-1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4',5,8,8'-hexahidro-exo-1,4-endo-5,8-dimetanonaftaleno). Este compuesto tampoco es sensible a los álcalis, pero su tensión de vapor es menor. Ambos son tóxicos para los organismos de sangre caliente y están catalogados como posibles carcinógenos. Son absorbidos a través del tracto respiratorio, el canal digestivo y la piel, pudiendo afectar al sistema nervioso central y periférico.

El **isodrín** es el isómero endo-endo del aldrín. Es menos estable que éste, pero más eficaz y su toxicidad para los organismos de sangre caliente es mayor. El isodrín se transforma rápidamente en su epóxido, el **endrín**, a su vez isómero endo-endo del dieldrín. El endrín es moderadamente volátil y menos estable que el epóxido anteriormente citado, es uno de los insecticidas más potentes y muy venenoso para los organismos de sangre caliente. Los dos metabolitos más importantes del endrín son el **endrín aldehído** y la **endrín cetona**.

El **clordano** técnico es una mezcla de clordano, nonacloro, heptacloro y otros isómeros de clordano. Esta mezcla es muy sensible a la acción de los álcalis, pudiendo acelerarse su descomposición por la presencia de compuestos de hierro. Ejerce su efecto insecticida como veneno por contacto, por vía respiratoria o por vía digestiva. El clordano puro (4,7-metano-1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-3',4,7,7'-tetrahidroindano) comprende dos isómeros geométricos con 8 átomos de cloro en sus moléculas, siendo el más tóxico el isómero cis o γ . Ambos pueden deshidrogenarse a una olefina y posteriormente epoxidarse para dar **oxiclordano** (similar al dieldrín). La exposición al clordano en elevadas dosis afecta a los sistemas neurológico e inmune y ha sido clasificado por la USEPA como probable carcinogénico.

El **heptacloro** (1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-4,7-metano-3',4,7,7'-tetrahidroindeno) es el más eficaz de los componentes del clordano técnico. En los insectos se metaboliza a **heptaclorepóxido** que es más activo.

Otro insecticida del tipo dieno es el **endosulfán** (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5',6,9,9'-hexahidro-6,9-metileno-2,3,4-benzodioxatíepin-3-óxido). El producto técnico es mezcla de los dos isómeros α y β respecto a la posición exo y endo del grupo sulfito. Su presión de vapor es baja y es muy estable en agua, pero se transforma en el diol cuando se trata con álcalis o ácidos. Es tóxico para organismos de sangre caliente pero no persiste en ellos, ya que se hidroliza al dialcohol y se oxida hasta transformarse en **endosulfán sulfato** (figura I-6) [Hassall, 1990].

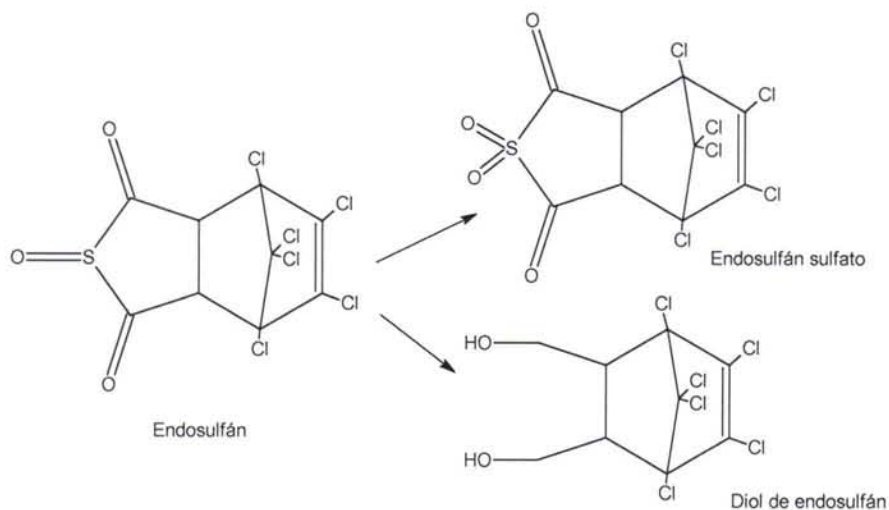


Figura I-6. Endosulfán y metabolitos.

3. LEGISLACIÓN

Debido a la toxicidad que presentan los pesticidas, su presencia en el medioambiente se considera nociva, y por ello su fabricación, comercialización y empleo están regulados por la legislación.

La legislación española sobre plaguicidas surge con motivo de la transposición de la Directiva 78/631/CEE de 26 de junio del Consejo (DOCE 206/L de 29 de julio de 1978), junto con las sucesivas modificaciones posteriores, y queda regulada principalmente por el Real Decreto 3349/1983 de 30 de noviembre (BOE nº 20 de 24 de enero de 1984), por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria (RTS) para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, y por el Real Decreto 162/1991, de 8 de febrero (BOE nº 40 de 8 de febrero de 1991), por el que se modifica la RTS anterior.

Además, la legislación establece valores máximos aconsejables para la presencia de los pesticidas en los distintos compartimentos ambientales.

3.1. Aguas

En lo que concierne a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano la legislación comunitaria más reciente es la Directiva 98/83/CE de 3 de noviembre (DOCE 330/L de 5 de diciembre de 1998), que ha sido incorporada a la legislación española en el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero (BOE nº 45 de 21 de febrero de 2003). El valor paramétrico que establece para plaguicidas individuales es de 0.10 µg/L y para plaguicidas totales (suma de todos los plaguicidas detectados y cuantificados en el procedimiento de control) es de 0.50 µg/L. Para el caso del aldrín, dieldrín, heptacloro y heptaclorepóxido, el valor paramétrico es de 0.03 µg/L. La Directiva propone como método de análisis cualquiera que proporcione que su exactitud, precisión y límite de detección sean del 25% del valor paramétrico.

Los vertidos de pesticidas a las aguas están limitados por la normativa comunitaria. La Directiva 84/491/CEE de 9 de octubre (DOCE 274/L de 17 de octubre de 1984), establece valores límite y objetivos de calidad para los vertidos de hexaclorociclohexano (HCH) en aguas. La Directiva 86/280/CEE de 12 de junio (DOCE 181/L de 4 de julio de 1986) establece límites para los vertidos de DDT y sus derivados. La modificación de esta directiva por la 88/347/CEE del 16 de junio (DOCE L 158 de 25 de junio de 1988) incluye limitaciones también para el vertido de hexaclorobutadieno, hexaclorobenceno, aldrín, isodrín, dieldrín y endrín.

Además el α -endosulfán y el γ -HCH (lindano) están clasificados como sustancias peligrosas prioritarias en el ámbito de la política de aguas en la Decisión N° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de noviembre (DOCE L 331 de 15 de diciembre de 2001), que modifica la Directiva 2000/60/CE de 23 de octubre (DOCE L 237 de 22 de diciembre de 2000). Por otra parte los pesticidas organoclorados están clasificados como productos prohibidos en el *Protocolo del Tratado Antártico sobre la Protección del Medio Ambiente* (BOE 42 de 18 de febrero de 1998), prohibiendo su introducción en la tierra, plataformas de hielo o agua del área del Tratado Antártico.

En otros países la presencia de estos compuestos también está regulada, así la “*Office of Water*” de la USEPA, establece para cada pesticida niveles individuales máximos aconsejables para la salud. Estos niveles no son tan estrictos como los fijados por la legislación europea, y así para el aldrín el valor máximo permitido es de 2 µg/L [Barceló y Hennion, 1997].

3.2. Suelos

Los pesticidas y los residuos procedentes de la formulación, fabricación, distribución y utilización de pesticidas orgánicos están incluidos en la lista de residuos peligrosos aprobada por la Decisión 94/904/CE de 22 de diciembre (DOCE L 356 de 31 de diciembre de 1994).

Dentro de Europa, es la ley holandesa la que con mayor rigor ha tratado el problema de los suelos contaminados. En la Lista o Norma Holandesa, inicialmente conocida como Lista ABC y luego modificada a “*New Dutch List*”, se dan los valores guía para los distintos contaminantes en los suelos y en las aguas subterráneas, proponiendo un valor óptimo o de fondo, y un valor por encima del cual es necesario realizar una descontaminación (valor de intervención). En la tabla I-3 se muestran los valores que establece esta lista para pesticidas organoclorados [Layla-Resources-Ltd, 1999].

Tabla I-3. Concentraciones óptimas y de intervención en suelo y aguas subterráneas establecidos en la lista holandesa.

Sustancias químicas	Suelo (mg/kg seco)		Agua subterránea (µg/L)	
	Valor óptimo	Valor de intervención	Valor óptimo	Valor de intervención
Suma de DDT, DDD y DDE	0.0025	4	*LD	0.01
Aldrín	0.0025	-	LD	-
Dieldrín	0.0005	-	0.02 ng/L	-
Endrín	0.001	LD	-	-
Total "Drins"	-	4	-	0.1
α-HCH	0.0025	-	LD	-
β-HCH	0.001	-	LD	-
γ-HCH	0.05 µg/kg	-	0.2 ng/L	-
Suma de HCHs	-	2	-	1

*LD: límite de detección

En España, a pesar de tener una normativa muy amplia, no tenemos marcadores de nivel o normativas aplicadas a los análisis de suelos y se están utilizando los marcadores holandeses.

En la Comunidad Autónoma de Galicia, el Decreto 263/1999 de 30 de septiembre (DOGA 186 de 24 de septiembre de 1999) (corrección de errores DOGA 210 de 29 de octubre de 1999) fija la concentración límite en suelos afectados por vertidos de residuos de HCH. La concentración límite (límite superior de aceptabilidad de riesgo) de HCH que establece para la intervención en el suelo, cualquiera que sea su naturaleza y uso, es de 2 mg/kg (materia seca), entendiendo como HCH a la suma de los isómeros α, β, γ y δ del hexaclorociclohexano.

3.3. Otras matrices

Como consecuencia de la presencia de los pesticidas en las aguas y los suelos, éstos pueden encontrarse presentes en los productos de origen vegetal. Dada la importancia que tienen dichos productos para la alimentación, la presencia de pesticidas en los mismos está legislada.

El Real Decreto 280/1994 del 18 de febrero (BOE nº 58 de 9 de marzo de 1994), establece en su Anexo II los límites máximos de residuos (LRM) de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal. Este Anexo ha sido modificado recientemente en la Orden PRE/3057/2003 de 30 de octubre (BOE nº 265 de 5 de noviembre de 2003). El nivel máximo permitido de cada pesticida se establece en función de la especie vegetal considerada. Así por ejemplo para metoxicloro el LMR varía entre 10 mg/kg en frutas, hortalizas, infusiones, forrajes y especias..., y 1 mg/kg en legumbres, semillas, lúpulos, etc. Los valores más habituales que se estableces para pesticidas organoclorados en estas matrices están comprendidos entre 0.01 y 10 mg/kg.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Águeda J.A. (1997). Las aguas continentales de superficie y subterráneas como receptores de la contaminación. En: Contaminación e ingeniería ambiental. Oviedo.
- Albornoz H. (2003). La docena sucia de compuestos peligrosos será eliminada según una decisión de la ONU.
http://www.ambienteenergia.com/htms/notas/nota_0254.htm. (Julio, 2004).
- Alegria H.A., Bidleman T.F., Shaw T.J. (2000). Organochlorine pesticides in ambient air of Belize, Central America. *Environmental Science and Technology*, 34, 1953-1958.
- Álvarez-Campana J.M. (2001). Contaminación del suelo debida a procesos industriales.
http://origen.dihma.upv.es/contamin/pdf/Alvarez_Campana.PDF. (Julio, 2004).
- Barceló D., Hennion M.-C. (1997). Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier, The Netherlands.
- Biziuk M., Przyjazny A., LCzerwinski J., M.Wiergowski (1996). Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, 754, 103-123.
- Canada's-Parliament (2000). Pesticides. Making the right choice for the protection of health and the environment. Report of the standing committee on Environment and sustainable development.
- Davis D.L., Bradlow H.L. (1995). Can Environmental Estrogens cause breast cancer? *Scientific American*, 273, 144-147.
- Dejonckheere W., Steurbaut W., Drieghe S., Verstraeten R., Braeckman H. (1996). Monitoring of pesticide residues in fresh vegetables, fruits, and other selected food items in Belgium, 1991-1993. *Journal of AOAC International*, 79, 97-110.
- Dogheim S.M., Mohamed E.-Z., Alla S.A., El-Saied S., Emel S.Y., Mohsen A.M., Fahmy S.M. (1996). Monitoring of pesticides residues in Human milk, soil, water, and food samples collected from Kafr El-Zayat Governorate. *Journal of AOAC International*, 79, 111-116.

- Domínguez J.A. (1997). Inquinosa, diez años de historia.
<http://www.quercus.es/redquercus/Articulos/inquinos.htm>. (Julio, 2004).
- Earthfax (2002). Fungal bioremediation of soils affected by a wood preservative.
http://www.earthfax.com/Expertise/Environmental_SoilContam.htm. (Julio, 2004).
- Fatoki O.S., Awofolu R.O. (2003). Methods for selective determination of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments by capillary gas chromatography and electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 983, 225-236.
- García I., Dorronsoro C. (2003). Contaminación del suelo.
<http://edafologia.ugr.es/conta/tema00/home.htm>. (Julio, 2004).
- Guardo A.D., Calamari D. (2000-2002). Modelling approaches to study the recent DDT contamination of Lake Maggiore (Italy).
<http://www.icps.it/english/bollettino/psn97/970208.htm>. (Julio, 2004).
- Hassall K.A. (1990). The biochemistry and uses of pesticides. VCH, Weiheim. Alemania.
- IHOBE S.A. (2001). Comisión técnica del Ayuntamiento de Barakaldo sobre los residuos de HCH. <http://www.ihobe.es/Infraestructuras/HCH/hch.htm>. (Julio, 2004).
- Jayaraman N. (1998). International POPs hotspots list. European ECO Forum.
<http://www.ljudmila.org/retina/eco-forum/pr-gp-pops.html>. (Julio, 2004).
- Kimball's Biology Pages (2001).
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DDTandTrophicLevels.html>. (Julio, 2004).
- Layla Resources Ltd (1999). The new Dutch List.
<http://www.contaminatedland.co.uk/std-guid/dutch-l.htm>. (Julio, 2004).
- López F.J., Pitarch E., Egea S., Beltran J., Hernández F. (2001). Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorous pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 433, 217-226.

- Martínez-Lozano F., González-Rodríguez M.O. (1999). Zonas de actuación dentro del marco de la investigación de suelos contaminados por residuos de Lindano en el polígono de Torneiros-O Porriño (Pontevedra).
- Matolcsy G., Nádasz M., Andriska V. (1988). *Pesticide Chemistry*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. The Netherlands.
- Novotny V., Olem H. (1994). *Water Quality. Prevention, identification and management of diffuse pollution*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Ólafsdóttir K., Petersen A., Thórdardóttir S., Jóhannesson T. (1995). Organochlorine residues in gyrfalcons (*Falco rusticolus*) in Iceland. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 382-389.
- Oliva-Ortiz J., Vidal-Otón J., Barba-Navarro A., Pérez-Sirvent C., Martínez-Sánchez M.J., Molina-Ruiz J. (2002). Spatial-temporal distribution of endosulfan sulfate and dieldrin (organochlorides) in horticultural soils. VII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field. Valladolid.
- Pardo F., Marañón E. (1997). Contaminación oceánica de las aguas. En: *Contaminación e ingeniería ambiental*. FICYT. Oviedo.
- Rico M.C., Henández L., Fernández M., González M.J., Montero M. (1989). Organochlorine contamination in water of the Doñana National Park. *Water Research*, 23, 57-60.
- Serrano A. (2000). Río Cinca. *La Gaceta de Afema*, 61, http://www.izquierda-unida.es/Areas/AreaMedioAmbiente/Gaceta_AFEMA/Numeros/61.htm. (Julio, 2004).
- Silgoner I., Krska R., Lombas E., Gans O., Rosenberg E., Grasserbauer M. (1998). Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from sediments and its application to contaminated sediment samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 362, 120-124.
- Singh R.P. (2001). Comparison of organochlorine pesticide levels in soil and groundwater of Agra, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 126-132.

Vassilakis Y., Tsipi D., Scoullou M. (1998). Determination of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection, and high performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823, 49-58.

Xunta (1999). Investigación no Polígono de Torneiros - O Porriño (Pontevedra).
<http://www.xunta.es/conselle/cma/CMA04d/CMA04dh/p04dh03b.pdf>. (Julio, 2004).

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral se engloba dentro de una de las líneas de investigación del Departamento de Química Analítica de la Universidad de A Coruña, que trata sobre el desarrollo y aplicación de metodologías analíticas para la determinación de compuestos orgánicos en diferentes matrices de interés medioambiental.

Los pesticidas organoclorados constituyen un grupo de compuestos de gran relevancia dada su toxicidad, persistencia y bioacumulación. Son considerados contaminantes de interés prioritario por diversos organismos oficiales tales como la Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos, y algunos de ellos están incluidos en el grupo de compuestos seleccionados por la Convención de las Naciones Unidas para su total eliminación, lo que se firmó en el año 2001 en el Convenio de Estocolmo. Muchos de ellos son, además, sospechosos de producir cáncer, y alterar las funciones endocrinas. Por todo esto, su determinación a niveles traza en diversas matrices es de gran interés.

En este trabajo se desarrollan métodos cromatográficos que permitan determinar pesticidas organoclorados a niveles incluso de ultratrazas, empleando para ello distintos tipos de inyectoras de grandes volúmenes, que serán optimizados con el fin de obtener las mejores condiciones de análisis para los compuestos de interés.

Se desarrollan también varios procedimientos para llevar a cabo la extracción de pesticidas organoclorados de muestras acuosas, así como diversos métodos de extracción para el análisis de los pesticidas en muestras sólidas, que comprende desde la extracción clásica con ultrasonidos, hasta la extracción con líquidos a presión, de aparición más reciente. Asimismo se pone a punto un método para llevar a cabo la adecuada purificación de los extractos, con objeto de reducir las interferencias de la matriz.

Finalmente se realiza la aplicación práctica de la metodología desarrollada para llevar a cabo el estudio de un área contaminada por pesticidas que se encuentra situada en el polígono industrial de Torneiros (Porriño, Pontevedra).

CAPÍTULO III: DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

CAPÍTULO III: DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

1. INTRODUCCIÓN	35
1.1. Técnicas cromatográficas.....	35
1.2. Aplicación de la cromatografía de gases al análisis de pesticidas organoclorados	36
1.3. Sistemas de inyección en cromatografía de gases. Inyectores de grandes volúmenes	38
1.4. Diseños de experiencias aplicados a la optimización de las condiciones instrumentales de un inyector	44
2. MATERIAL, INSTRUMENTAL Y REACTIVOS.....	47
2.1. Material e instrumental	47
2.2. Reactivos.....	48
3. ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	49
4. INYECCIÓN SPLIT/SPLITLESS.....	56
4.1. Estudio de las condiciones de inyección	56
4.2. Características analíticas del método.....	60
5. INYECCIÓN <i>SPLIT/SPLITLESS</i> CON TEMPERATURA PROGRAMADA Y DETECCIÓN MS (PSS-GC-MS).....	62
5.1. Estudio de las condiciones de inyección	63
5.2. Identificación de las variables significativas.....	64
5.3. Optimización de las variables significativas.....	70
5.4. Características analíticas del método.....	73
6. INYECCIÓN <i>SPLIT/SPLITLESS</i> CON TEMPERATURA PROGRAMADA Y DETECCIÓN ECD (PSS-GC-ECD).....	76
6.1. Estudio de las condiciones de inyección	76

6.2. Identificación de las variables significativas	76
6.3. Optimización de las variables significativas	81
6.4. Características analíticas del método	85
7. INYECCIÓN DE GRANDES VOLÚMENES <i>ON-COLUMN</i> Y DETECCIÓN ECD (LVOCI-GC-ECD)	88
7.1. Descripción del sistema LVOCI.....	88
7.2. Estudio de las condiciones de separación	90
7.3. Identificación de las variables significativas	94
7.4. Optimización de las variables	102
7.5. Características analíticas del método	109
8. COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INYECCIÓN ESTUDIADOS.....	111
9. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE ENDRÍN y p,p'-DDT CON LOS DISTINTOS SISTEMAS DE INYECCIÓN	114
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Técnicas cromatográficas

Para llevar a cabo la determinación de pesticidas organoclorados se han utilizado, a lo largo de los años, diferentes técnicas. Antes de los años 50 las técnicas de determinación disponibles para el análisis traza de compuestos orgánicos eran muy limitadas. Inicialmente se emplearon métodos espectroscópicos basados en reacciones colorimétricas [Feigl y Oesper, 1960]. Sin embargo con estos métodos no se podía determinar más de un pesticida simultáneamente, y no se conseguían aislar los analitos de interés de la matriz con lo cual los efectos de las interferencias eran muy importantes. El primer paso en el desarrollo de los métodos de análisis multiresiduo, fue la cromatografía de capa fina (TLC, *thin layer chromatography*), con detección en placa basada en la actividad biológica [Weltzien, 1958].

El desarrollo de las técnicas cromatográficas de separación supuso un gran avance en los métodos analíticos de determinación, y actualmente son las técnicas más utilizadas para llevar a cabo la separación analítica, identificación y cuantificación de residuos de pesticidas en diferentes matrices ambientales.

Han sido muchos los avances que se han introducido en los últimos tiempos. Tal vez el principal sea la introducción del detector de captura de electrones (ECD, *electron capture detector*) a la cromatografía de gases en los años 60, lo que permitió el análisis simultáneo de varios pesticidas organoclorados a niveles cientos de veces inferiores a los obtenidos con los detectores de ionización de llama disponibles hasta ese momento. Además, la sustitución de las columnas empaquetadas empleadas inicialmente por columnas capilares mejoró en gran medida la resolución.

Asimismo, la introducción de los sistemas híbridos de cromatografía y espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), en cromatografía de gases en los años 80, y más tarde también en cromatografía de líquidos, supuso un salto cualitativo en el análisis de estos compuestos. La mejora de las interfases y la aparición de equipos de sobremesa ha hecho que la espectrometría de masas se

use no sólo como técnica de confirmación, sino también como única técnica de detección, tanto con espectrómetros cuadrupolares, como con trampas iónicas, algo más sensibles que los primeros pero de implantación más reciente.

Todos estos avances han supuesto una mejora en la aplicabilidad, selectividad, sensibilidad, exactitud y precisión de los análisis, consiguiendo reducir en muchos casos la cantidad de muestra, la velocidad del análisis y los residuos generados [Sherma, 1999]. Además han permitido el desarrollo de sistemas cromatográficos que permiten llevar a cabo la preparación de muestras y el análisis *on-line*.

Por último hay que indicar que el empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, *high performance liquid chromatography*), la electroforesis capilar y los inmunoensayos ha permitido llevar a cabo la separación, detección y cuantificación de un amplio rango de pesticidas volátiles, semivolátiles, no volátiles y termolábiles.

1.2. Aplicación de la cromatografía de gases al análisis de pesticidas organoclorados

Dentro de la cromatografía la elección entre cromatografía de gases y cromatografía de líquidos depende del comportamiento de los analitos. La cromatografía de líquidos es más rápida que la cromatografía de gases y de aplicación casi universal. Además presenta como ventaja la posibilidad de acoplarse en continuo a la extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) más fácilmente que la cromatografía de gases. Sin embargo las columnas de HPLC no consiguen la resolución de las columnas capilares de cromatografía de gases y el detector con el rango más amplio de aplicación, el ultravioleta-visible, no suele ser tan sensible como los detectores específicos de cromatografía de gases. Así esta técnica ha sido utilizada en la determinación de pesticidas carbamatos mediante detección de fluorescencia [Chee y cols., 1996; Vassilakis y cols., 1998; Fillion y cols., 2000], o utilizando detección de red de diodos y confirmación con espectrometría de masas para la determinación de pesticidas polares [Almeida-Azevedo y cols., 2000], acoplada a un espectrómetro de masas con ionización química a presión

atmosférica para la determinación de triazinas [Aguilar y cols., 1999], o con electrospray para el análisis de 45 pesticidas que incluyen triazinas, carbamatos y fenilureas [Crescenzi y cols., 1997]. Como se ha mencionado anteriormente, también se ha empleado la técnica acoplada a la extracción en fase sólida [Hennion, 1998; Masqué y cols., 1998].

Para el análisis de pesticidas volátiles y termoeestables se prefiere emplear la cromatografía de gases debido a su alta resolución y a la posibilidad de utilizar detectores muy sensibles y específicos.

Las columnas que se utilizan son diversas, pues no existe un tipo universal de columna cromatográfica para el análisis de pesticidas. Normalmente son columnas capilares recubiertas de fases no polares como las de polidimetilsiloxano con las que se han separado 17 pesticidas de distintas familias como organoclorados, triazinas y organofosforados [Aguilar y cols., 1997]. Otras columnas muy utilizadas son las de baja polaridad como las de fenilmetilsiloxano, siendo las más habituales las que contienen un 5% de fenilo. Así por ejemplo se ha empleado una columna de este tipo en la determinación de 16 pesticidas organoclorados en aguas con detección por captura de electrones [Quayle y cols., 1997], o para separar 6 herbicidas ácidos y posterior detección por espectrometría de masas [Vassilakis y cols., 1998]. Existen también columnas especiales para el análisis de pesticidas, con fase de metil-fenil-cianosilicona, que consiguen una mejor separación de los compuestos. Empleando columnas de este tipo se analizaron 47 pesticidas sensibles al detector de captura de electrones [Miliadis, 1998] y 7 pesticidas organoclorados en muestras de plantas medicinales con detección por espectrometría de masas y ECD [Ho y Hsieh, 2001]. Los diámetros internos, espesor de la película y longitudes varían según el caso.

La determinación final tiene lugar, en la mayoría de las ocasiones, acoplando detectores específicos tales como el ECD [Jackson y Andrews, 1998; Russo y cols., 1998] que es altamente sensible a compuestos con átomos electronegativos en sus moléculas, y es el detector más ampliamente utilizado para el análisis de pesticidas organoclorados, o el de nitrógeno-fósforo (NPD, *nitrogen phosphorous detector*) [Sabik y Jeannot, 1998; Vassilakis y cols., 1998],

adecuado para compuestos que contengan N o P, y muy utilizado en el análisis de triazinas, o detectores más universales como el espectrómetro de masas [Pocurull y cols., 1998; Singh y cols., 1998].

La espectrometría de masas es una herramienta muy útil en el análisis de pesticidas porque permite la identificación y cuantificación simultánea de gran número de compuestos, evitando análisis sucesivos con distintos detectores selectivos. Sin embargo, la gran sensibilidad requerida para el análisis de muestras medioambientales restringe normalmente su uso a la confirmación de la identidad de los picos, mientras que la cuantificación se hace con un detector selectivo. Sin embargo, gracias al uso de técnicas de inyección de gran volumen [Termonia y Termonia, 1997; Wylie, 1997; Crockett-Butler y cols., 1999; Agüera y cols., 2000] o al acoplamiento de técnicas de extracción *on-line* [Hankmeier y cols., 1999], así como el uso de CG-MS-MS [Vidal y cols., 2002] ha mejorado notablemente los límites de detección de esta técnica haciéndola más útil en el análisis de pesticidas organoclorados.

En este trabajo se empleará tanto la detección con captura de electrones como la espectrometría de masas, que principalmente se utilizará como técnica de confirmación de la identidad de los picos.

1.3. Sistemas de inyección en cromatografía de gases. Inyectores de grandes volúmenes

Hay muchos modos de introducir la muestra en una columna cromatográfica. El sistema de inyección suele escogerse teniendo en cuenta la naturaleza de la matriz, los componentes de la muestra y el tipo de columna utilizada. Existen varios tipos de inyectores: inyector *split/splitless*, inyector de vaporización con temperatura programada (PTV, *programmed temperature vaporizer*), inyector *on-column*, y más recientemente la inyección *AT-column* que combina el empleo de bucles con el desbordamiento de vapor (*vapour overflow*) [Koning y cols., 2004]. Así, estas técnicas se definen en función de varios criterios [Teske y Engewald, 2002]:

- Lugar donde se deposita la muestra líquida y donde se produce la evaporación. Esto se lleva a cabo directamente en la columna cromatográfica (en los inyectores *on-column*) o en una cámara especial de vaporización, que puede ser de temperatura constante o programada.
- Localización de la separación disolvente/analito, que puede producirse en la cámara de vaporización, en una precolumna o directamente en la columna.
- Mecanismo de concentración del analito: atrapamiento en frío, efecto disolvente o concentración en la fase estacionaria.
- Flujo de gas durante la introducción de la muestra. Normalmente se aplica un flujo constante de gas para favorecer la eliminación del vapor de disolvente, sin embargo también se emplea el *vapour overflow*, en el cual el flujo de gas se detienen durante la inyección de la muestra, produciéndose un flujo como consecuencia de la expansión del vapor de disolvente.
- Eliminación del disolvente evaporado, que se realiza bien a través de la salida del *split* o de la purga del *septum*, o bien a través de una válvula situada entre la precolumna y la columna analítica.

Existen además otros modos de inyección como es el uso de la técnica de espacio de cabeza, la desorción térmica, la purga y atrapamiento, etc. [Tipler, 1993].

El inyector más comúnmente utilizado en el análisis de pesticidas es el inyector *split/splitless* (figura III-1). El proceso de inyección es sencillo, la muestra se introduce en un *liner* caliente, y una válvula situada a la salida del mismo permite llevar a cabo la inyección en modo *split* o en *splitless*, es decir, con o sin división de flujo. La combinación entre la posible existencia de sitios activos en el *liner* y la elevada temperatura que se emplea con este inyector puede provocar la descomposición de compuestos termolábiles [Hoff y Zoonen, 1999].

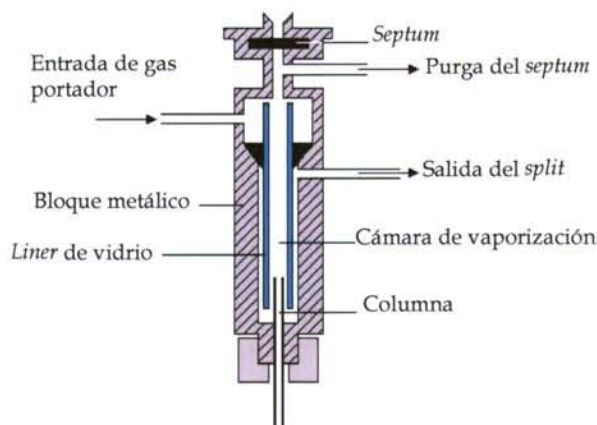


Figura III-1. Inyector *split/splitless*.

En los últimos tiempos las técnicas de inyección de grandes volúmenes han demostrado ser de gran utilidad para mejorar la sensibilidad de las determinaciones cromatográficas. Existen varios sistemas de inyección de gran volumen que han sido probados para la determinación de pesticidas: inyección por vaporización con temperatura programada empleada para la inyección de diversas sustancias como toxafeno y PCBs [Stottmeister y cols., 1991], pesticidas organonitrogenados, organofosforados y organoclorados con detectores NPD y ECD [Mol y cols., 1996] y organoclorados con detección MS [Concha-Graña y cols., 2002]; inyección *on-column*, empleada para la determinación de triazinas [Beltran y cols., 1997] o en el análisis de pesticidas a niveles de hasta 10 ng/L [Termonia y Termonia, 1997]; o inyección *splitless* con división de flujo para el análisis de pesticidas organoclorados y organofosforados [Agüera y cols., 2000].

El inyector de vaporización con temperatura programada (PTV, *programmed temperature vaporizer* o PSS, *programmed split-splitless*, según la casa comercial) que se presentó inicialmente en 1979 por Vogt y cols [Vogt y cols., 1979], es una mejora del inyector *split-splitless* y su diseño es similar (figura III-2). Sus ventajas sobre otras técnicas son la menor discriminación de los analitos, mejores recuperaciones de compuestos termolábiles, y atenuación de los problemas

producidos por compuestos no volátiles presentes en las muestras que se observan en la inyección *on-column*. Además permite inyectar volúmenes de hasta varios cientos de microlitros [Godula y cols., 2001].

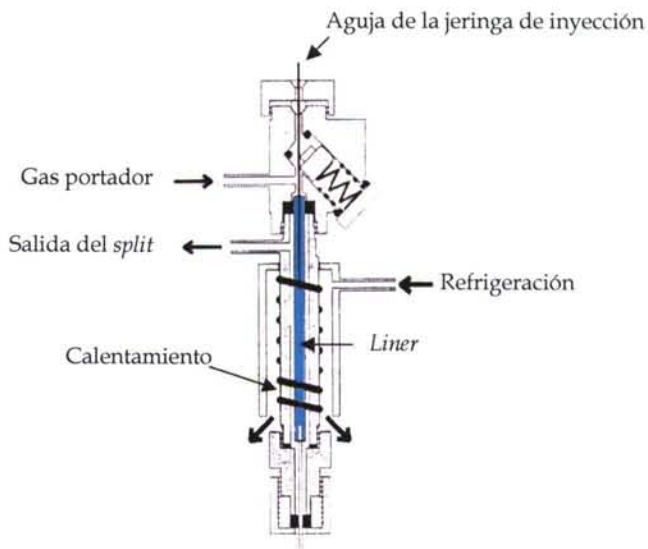


Figura III-2. Esquema de un inyector tipo PTV [Mol y cols., 1995b].

Estos inyectores pueden operar de varios modos [Engewald y cols., 1999]:

- *PTV splitless*, en el cual la muestra se introduce con el inyector a una temperatura inferior o próxima al punto de ebullición del disolvente, y la salida del *split* permanece cerrada durante la evaporación. Esta técnica es válida para inyectar entre 1 y 20 μL .

- *PTV con eliminación del disolvente (solvent-split o solvent-vent)*. En este caso la muestra se inyecta a una temperatura inferior a la temperatura de ebullición del disolvente, que se mantiene mientras se produce la eliminación del mismo a través del *split*. Posteriormente, y una vez cerrada la válvula, se produce el calentamiento del inyector, transfiriéndose los analitos a la columna. En ocasiones, y siempre y cuando no exista riesgo de degradación de los compuestos o

adsorción de los mismos a sitios activos del recubrimiento, el *liner* se rellena con lana de vidrio o se recubre con otros materiales como PTFE, Dexsil, etc. Con este modo de inyección es posible introducir volúmenes de muestra mayores, llegando incluso a varios cientos de microlitros.

- *PTV con desbordamiento de vapor (vapour overflow)*. El inyector está a mayor temperatura que el punto de ebullición del disolvente cuando se introduce la muestra. La válvula de *split* permanece cerrada mientras se produce la evaporación de la misma, mientras que la purga del *septum* permanece abierta para eliminar los vapores de disolvente. La evaporación del disolvente provoca la formación de un "punto frío" en el *liner* donde los analitos se concentran. Una vez eliminado el disolvente se produce el calentamiento del *liner* y los analitos son transferidos. El inconveniente de esta técnica es la pérdida de los analitos más volátiles que puede producirse durante la etapa de desbordamiento del vapor.

- *PTV con adsorción/desorción térmica*, que se emplea para determinación de contaminantes en muestras de agua. Consiste en atrapar los analitos en un material adsorbente colocado en el *liner* a través del cual se hace pasar la muestra. El agua residual se elimina con un flujo de gas portador a contracorriente, y una vez eliminada se calienta el *liner* y los analitos son transferidos a la columna [Godula y cols., 2001].

En la inyección **on-column** la muestra líquida se introduce directamente en la columna capilar, no existe ni cámara de evaporación ni se produce división de flujo, y debe realizarse de forma rápida y continua para que los compuestos se concentren en una franja estrecha de la zona de inyección y así evitar en la medida de lo posible formación de colas en los picos [Mol y cols., 1995b]. La temperatura inicial de la columna debe ser igual o inferior a la del punto de ebullición del disolvente. La evaporación se produce de forma rápida y brusca por lo que una parte importante de la muestra puede ser expulsada fuera de la columna [Grob, 1994; Mol y cols., 1995a].

Este sistema de inyección da muy buenos resultados cuantitativos, siendo muy adecuado para compuestos termolábiles y para mezclas de componentes con un amplio rango de volatilidades [Mol y cols., 1995b]. A pesar de ello presenta

algunos problemas, siendo el más importante la contaminación de la columna debido a residuos no volátiles que se acumulan en el punto de inyección, aunque esto puede evitarse en parte utilizando una precolumna como *retention gap*. Además presenta una baja reproducibilidad de los tiempos de retención [Mol y cols., 1996].

Una versión especial del inyector *on-column* estándar es el inyector *on-column* para inyección de volúmenes grandes de muestra (LVOCI, *large volume on-column injection*), que introduce un gran volumen de muestras líquidas directamente dentro de una precolumna capilar de sílice fundida. Entre esta precolumna de desolvatación y la columna analítica se sitúa una válvula (SVE, *solvent vapour exit*) que permite eliminar los vapores del disolvente (figura III-3). El incremento de sensibilidad que se produce se ve favorecido por dos efectos de concentración de los analitos que son el *solvent trapping* (atrapamiento del disolvente) y *phase soaking* (empapamiento de la fase). El efecto de *solvent trapping* se produce por la evaporación del disolvente desde la parte posterior hacia la parte frontal de la zona inundada que se forma en la precolumna. El segundo efecto ayuda a concentrar los compuestos más volátiles que no son totalmente retenidos por la capa de muestra que se extiende en el interior de la precolumna. A medida que el gas portador saturado con el vapor de disolvente pasa de la zona en la que está depositada la muestra hacia la zona de la precolumna recubierta, la fase estacionaria retiene el disolvente y aumenta de volumen. Para que estos efectos se produzcan de un modo adecuado es necesario que la zona no recubierta de la precolumna tenga una longitud al menos igual a la zona inundada que se forma con ese volumen de inyección [Anelli y cols., 2001].

Algunas de las ventajas que presenta este modo de inyección respecto a otros son su precisión, la eficacia en la transferencia de la muestras, elimina el sangrado del séptum, y evita la descomposición de productos térmicamente lábiles como el endrín al producirse el calentamiento en el horno y no en el inyector [Crockett-Butler y cols., 1999]. Su principal desventaja es que no pueden inyectarse muestras sucias sin que se produzca una pérdida en la eficacia o la posibilidad de que el sistema cromatográfico deje de ser inerte.

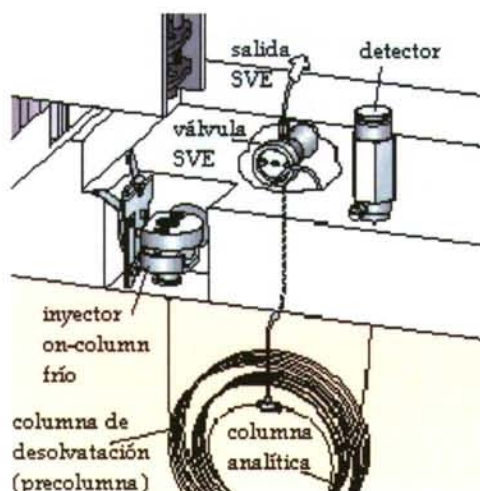


Figura III-3. Esquema de un sistema de inyección de grandes volúmenes *on-column* (LVOCI).

La principal aplicación de este modo de inyección es el análisis de muestras acuosas limpias, ya que debido al gran volumen que se inyecta, la presencia de sustancias interferentes puede resultar problemática. Así se ha empleado en el análisis en muestras de aguas de triazinas [Beltran y cols., 1997], al análisis de compuestos orgánicos volátiles y pesticidas [Anelli y cols., 2000], o la determinación de compuestos semivolátiles (pesticidas y HAP principalmente) [Crockett-Butler y cols., 1999].

1.4. Diseños de experiencias aplicados a la optimización de las condiciones instrumentales de un inyector

Actualmente, los diseños de experiencias son una herramienta fundamental en la química analítica cuando se trata de determinar las variables que más influyen en un determinado proceso y llevar a cabo su posterior optimización.

La optimización puede llevarse a cabo de modo *univariante* o *multivariante*. El procedimiento, llamado *clásico* o *univariante* consiste en fijar todas las variables

que afectan al sistema menos una, realizando experimentos con esta variable hasta seleccionar el valor óptimo de la misma. Se realiza lo mismo con todas las variables hasta que el proceso de búsqueda produzca un resultado no mejorable. Presenta varios inconvenientes: necesitan muchos experimentos (es decir, coste y tiempo elevados) para determinar la situación del óptimo del procedimiento y no tiene en cuenta las posibles interacciones entre variables.

En contraposición, la aproximación *multivariante* permite estudiar todas las variables que pueden o no interaccionar entre sí.

Estos estudios se pueden realizar desde dos puntos de vista. Por un lado los denominados de tipo analítico, en los que se quiere conseguir una descripción matemática lo suficientemente aproximada del sistema a estudiar (una ecuación) como para evaluar la localización del óptimo por derivación de dicha función. Las metodologías experimentales pertenecientes a este grupo (*diseños de experiencias*), utilizan diseños en los que todos los experimentos se planifican con anterioridad a su realización y se denominan de tipo simultáneo.

Por otra parte están los denominados de caja negra, en el que se asume un desconocimiento casi total del sistema aunque se sabe que tiene entradas (valores de las variables) y salidas (respuestas, resultados). En este caso, se diseñan estrategias consistentes en establecer cada experimento tras la evaluación de los resultados de los experimentos anteriores. Por ello, los métodos de este grupo, como el *simplex geométrico*, se denominan de tipo secuencial.

En este trabajo se han utilizado diseños de experiencias para determinar qué factores influyen en la eficacia de la evaporación de varios sistemas de inyección y establecer el conjunto de valores de las variables que conducen al mejor resultado. Los diseños de experiencias se pueden clasificar en:

- *Diseños factoriales* o *diseños completos de clasificación cruzada*. La respuesta se obtiene en función de todas las combinaciones posibles de niveles, cruzando los factores o variables.
- *Fracciones factoriales* o *diseños incompletos de clasificación cruzada*. Se escogen ciertas combinaciones de todas las posibles en un diseño

factorial. Estos diseños evitan el gran número de observaciones que requieren los diseños factoriales a muchos niveles y factores.

- *Diseños de clasificación jerárquica.* En ellos los factores están jerarquizados entre sí, por lo que no pueden existir interacciones entre ellos. Se utilizan en casos en los que existen factores que sólo pueden observarse para valores fijos de otros, por lo que carecería de sentido cruzarlos.
- *Diseños mixtos.* Donde se mezclan clasificaciones cruzadas y jerárquicas.

Cuando un sistema es poco conocido, resulta muy difícil decidir cuales son las variables que debemos considerar a la hora de optimizarlo. Algunas de esas variables pueden resultar evidentes pero no se puede descartar que otras, menos aparentes, tengan influencia en la superficie de respuesta. La solución más obvia sería considerarlas todas, pero entonces, el número de experimentos haría inviable en la práctica la aplicación de factoriales completos.

Entre los procedimientos que permiten abordar este problema de una manera eficaz, uno de los más interesantes son los *diseños de Plackett-Burman* que, basados en una extensión del sistema estadístico de los cuadrados latinos, no sólo reducen enormemente el número de experimentos a realizar sino que también producen otros datos de gran utilidad.

En este método, la matriz de diseño se construye partiendo de una primera fila dada en el trabajo original de Plackett-Burman [Plackett y Burman, 1946]. Con este tipo de diseños se pueden estudiar $k = N - 1$ variables en N ensayos, donde N tiene que ser múltiplo de 4, para mantener las características de ortogonalidad, es decir, el número de + y - en la matriz debe ser el mismo. El número mínimo de experimentos es 8, y en el caso de que el número de variables no sea el adecuado para construir el experimento, se debe considerar aquel más próximo, completándolo con variables asociadas a efectos falsos, llamadas *fantasma*, que sin tener influencia en el experimento, tampoco estorbarán a la hora

de efectuar las experiencias. Sin embargo estas variables fantasma pueden aportarnos información, ya que el coeficiente asociado a este tipo de variable debe ser cero o tener un valor muy pequeño. En caso contrario podría indicar la presencia de errores experimentales, o la presencia de variables o interacciones entre variables que no se han tenido en cuenta [Montgomery, 1991].

En este estudio la matriz del diseño Plackett-Burman la proporciona el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows 4.0 [Statistical-Graphics-Corp., 1999].

2. MATERIAL, INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

2.1. Material e instrumental

- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer PE 8700 equipado con inyector automático AS-2000B, inyector *split/splitless*, detector de captura de electrones (ECD) y estación de tratamiento de datos cromatográficos Turbochrom 4.
- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem equipado con inyector automático e inyector de gran volumen PSS (programmed *split/splitless*) y acoplado a un espectrómetro de masas Q-Mass 910.
- Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL equipado con inyector automático, inyector *split/splitless*, inyector de gran volumen PSS, control neumático programado (PPC, *programmed pneumatic control*), ECD, y estación de tratamiento de datos cromatográficos Totalchrom.
- Cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace GC, equipado con ECD, inyector automático AS-2000 con inyector *on-column* de gran volumen LVOCI, con estación de tratamiento de datos Chrom-Card-32 bit versión 2.2.
- Columna capilar de metil-fenil-cianosilicona 007-608 Quadrex, específica para la separación de pesticidas, con las siguientes dimensiones: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm .

- Columna capilar Agilent HP-5, 5% difenil 95% dimetilsiloxano, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm .
- Columna capilar J&W DB-35MS, 35% difenil 65% dimetilsiloxano, 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm .
- Columna capilar J&W DB-XLB con fase patentada de 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm .
- Precolumna MEGA, 15 m de longitud, con los últimos 3 metros recubiertos con SE-54 de 0.25 μm de espesor del film, y diámetro interno 0.53 mm.
- Jeringas Hamilton de 250 μL con aguja de 8 cm para la inyección *on-column*, y de 50 μL y 5 μL con aguja de 7 cm para la inyección en PSS y *splitless*, respectivamente.
- *Liners* de cuarzo con diámetro interno de 1 mm para la inyección *splitless* y 2 mm para inyección en PSS.
- Lana de vidrio silanizada de Supelco.
- Software Statgraphics Plus 4.0 para Windows.

2.2. Reactivos

- n-Hexano 95 %, calidad para análisis de residuos, Romil.
- Acetato de Etilo (PAR), para análisis instrumental, Panreac.
- Helio C-50, aire medicinal y nitrógeno N-50 de Carburos Metálicos.
- Helio, nitrógeno y aire Alphagaz de Air Liquid.
- Patrón combinado de pesticidas "*Appendix IX Organochlorine Pesticide Mix*", de Supelco, compuesto por aldrín, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, dieldrín, α -endosulfán, β -endosulfán, endosulfán sulfato, endrín, endrín aldehído, heptacloro, heptaclorepóxido (isómero B), metoxicloro, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, en una concentración de 2 mg/mL, disueltos en una mezcla tolueno:hexano (50:50).

- Patrones individuales de α -clordano y γ -clordano de 100 $\mu\text{g/mL}$ en hexano, y patron sólido de endrín cetona de Supelco. Patrones sólidos individuales p,p'-DDT, endrín e isodrín Pestanal de Riedel-de-Haën. Los compuestos que se emplearon como patrón interno (IS, *internal standard*) son decaclorobifenilo (DCBF) y 2,4,5,6-tetracloro-*m*-xileno (TCMX), suministrados como patrones sólidos por Supelco.
- Mezcla de pesticidas organoclorados "CLP" de Supelco, que contiene aldrín, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, dieldrín, α -endosulfán, β -endosulfán, endosulfán sulfato, endrín, endrín aldehído heptacloro, heptaclorepóxido (isómero B), metoxicloro, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, α -clordano, γ -clordano y endrín cetona en una concentración de 2 mg/mL, disueltos en una mezcla tolueno:hexano (50:50).

Las disoluciones madre de los patrones sólidos se realizaron en acetato de etilo con una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, y los patrones de trabajo fueron preparados por dilución de éstas en hexano, excepto los patrones empleados en la optimización del inyector on-column, que se prepararon en acetato de etilo.

3. ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

En el presente estudio se han empleado distintos tipos de columnas cromatográficas y cromatógrafos de gases según las necesidades de cada caso. Entre las columnas utilizadas se encuentra una con fase específica para la separación de pesticidas metil-fenil-cianosilicona (007-608 Quadrex), columnas de uso más general como HP-5, con fase 5% difenil 95% dimetilsiloxano, o la columna DB-35MS con un 35% de difenil, y una columna con fase patentada de 60 metros para una mejor separación DB-XLB.

Se ha realizado un estudio de la separación cromatográfica para todas ellas, ensayando diversos programas de temperatura hasta obtener la máxima resolución de los compuestos de interés.

Se calculó la resolución de los picos que no presentaba una resolución completa. Una vez escogida la rampa de temperatura se ensayaron distintas presiones de gas portador (Helio), para obtener la máxima resolución.

La resolución cromatográfica (R) viene dada por la razón entre la distancia entre dos picos (en tiempo de retención) y las anchuras en la base de los picos en cuestión (en unidades de tiempo). Este parámetro constituye una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar analitos. Una resolución de 1.25 permite una separación esencialmente completa de los compuestos, mientras que resoluciones inferiores a 1 darían lugar a resoluciones parciales de los compuestos [Skoog y Leary, 1994].

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

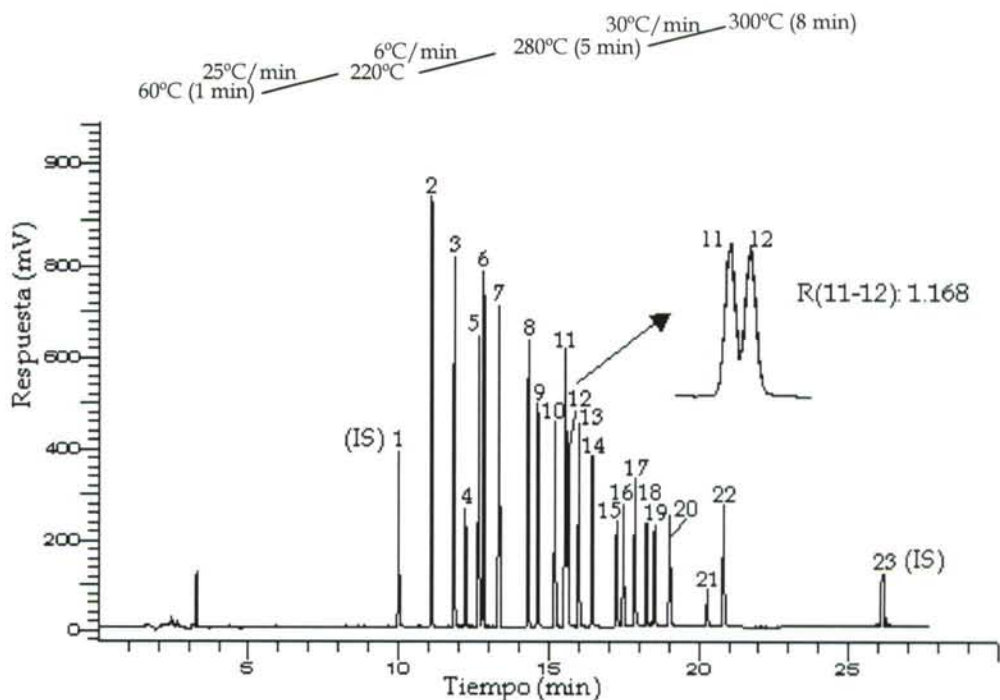
Los estudios de las condiciones más adecuadas para la separación de los compuestos seleccionados con la columna **Quadrex 007-608** se realizaron con el cromatógrafo de gases PE 8700, inyectando en modo *splitless* 1 μ L de patrón de 0.05 μ g/mL en las condiciones de la tabla III-1.

Tabla III-1. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de la separación con la columna Quadrex 007-608.

P Helio (portador)	T detector	T inyector	F N2 (detector)	F split	t apertura split
18 psig	350°C	260°C	57 mL/min	40 mL/min	1 min

Los programas de temperatura ensayados mostraron que la respuesta de los analitos es mayor cuando el programa empieza a 60°C, que es una temperatura ligeramente inferior a la temperatura de ebullición del disolvente (hexano: 69°C), ya que se favorece el efecto disolvente que concentra los analitos en el inyector.

La mejor resolución se ha obtenido con una presión de Helio de 18 psig y con el programa de temperatura que se muestra en la figura III-4.



1 TCMX (IS)	7 Aldrín	13 p,p'-DDE	19 Endrín aldehído
2 α -HCH	8 Isodrin	14 Dieldrin	20 Endosulfán sulfato
3 γ -HCH	9 Heptaclorepóxido	15 Endrín	21 Metoxicloro
4 β -HCH	10 γ -Clordano	16 p,p'-DDD	22 Endrín cetona
5 Heptacoloro	11 α -Clordano	17 β -Endosulfán	23 DCBF (IS)
6 δ -HCH	12 α -Endosulfán	18 p,p'-DDT	

(IS): Patrón interno.

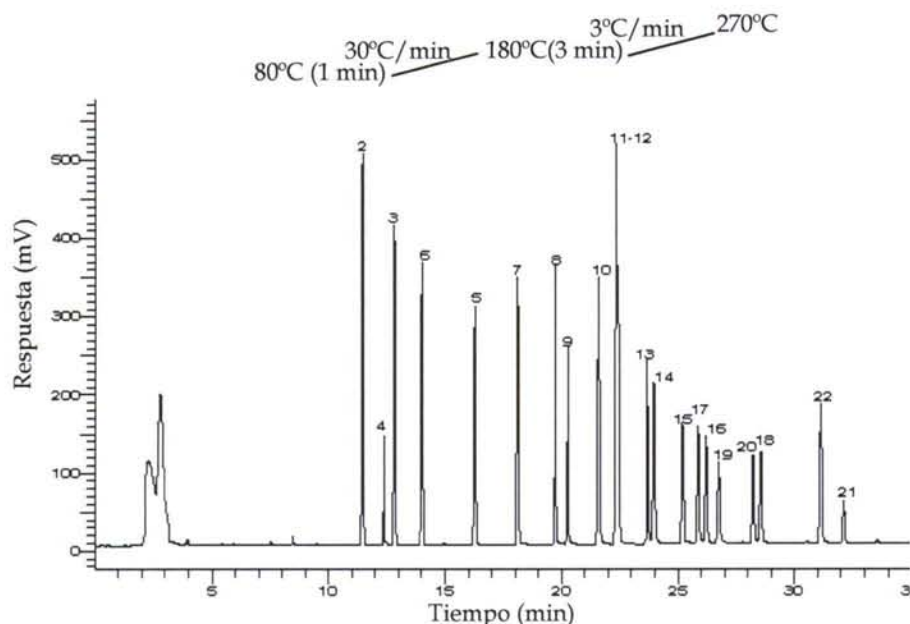
Figura III-4. Condiciones con las que se obtiene la mejor separación para la columna Quadrex 007-608.

En este mismo cromatógrafo se ensaya la columna HP-5, para la cual se obtiene una resolución menor, pues no se consigue separar todos los compuestos con ninguna de las rampas de temperatura ensayadas, coeluyendo el α -endosulfán y el α -clordano, y el tiempo total de análisis es superior al necesario para la columna Quadrex 007-608.

Las condiciones en las cuales se estudió la separación son las que se muestran en la tabla III-2 y la mejor resolución se obtiene utilizando el programa de temperatura de la figura III-5.

Tabla III-2. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de la separación con la columna HP-5.

P Helio (portador)	T detector	T inyector	F N ₂ (detector)	F <i>split</i>	t apertura <i>split</i>
12 psig	350°C	260°C	57 mL/min	23 mL/min	1 min

**Figura III-5.** Condiciones con las que se obtiene la mejor separación con la columna HP-5. Lista de compuestos en la figura III-4.

Como se indicó anteriormente, ambas columnas fueron estudiadas en el cromatógrafo PE 8700. Con este cromatógrafo no se ha conseguido separar totalmente el α -endosulfán y α -clordano en ninguno de los dos casos.

Posteriormente se empleó un cromatógrafo Autosystem XL que posee control neumático programado (PPC, *programmed pneumatic control*), que regula electrónicamente la presión y el flujo de gas portador, compensando las variaciones que provoca la temperatura. Al emplear las columnas antes citadas en este cromatógrafo con las mismas rampas de temperatura y trabajando a flujo de gas portador constante de 1 mL/min, se ha conseguido una mayor resolución de los picos 11 y 12 (α -endosulfán y α -clordano). En el caso de la columna HP-5 el

par 13-14 p,p'-DDE y dieldrín) se separa peor con este cromatógrafo, pero aún así, permite cuantificar todos los compuestos por separado. En la figura III-6 se presentan los cromatogramas obtenidos para las dos columnas con este cromatógrafo.

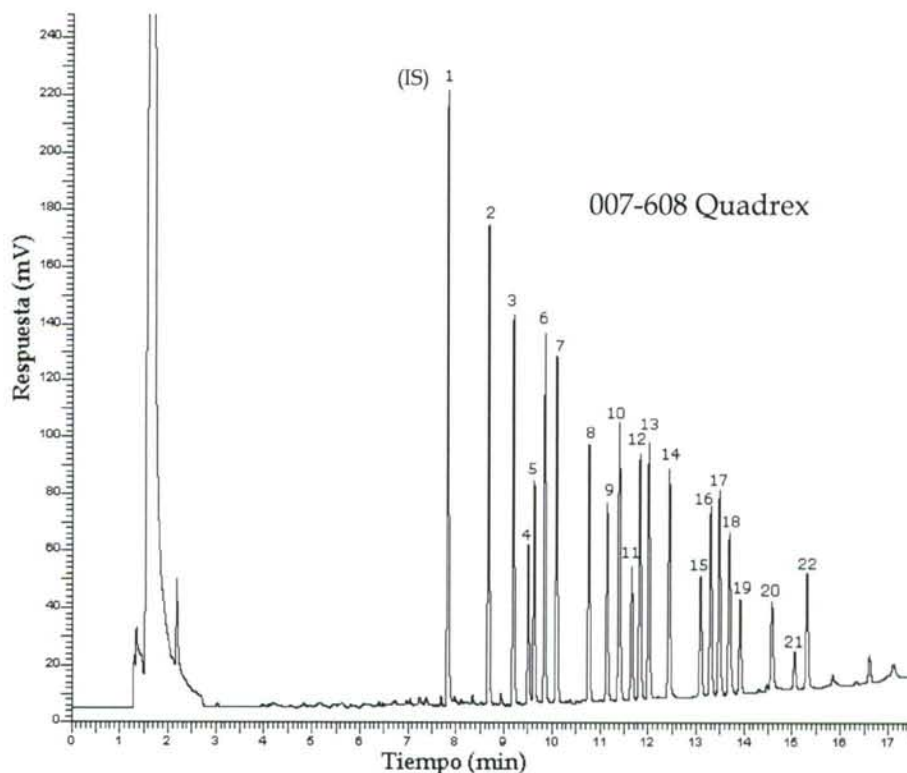


Figura III-6. Cromatogramas obtenidos con las columnas estudiadas en el equipo Autosystem XL. Lista de compuestos en la figura III-4 (continúa).

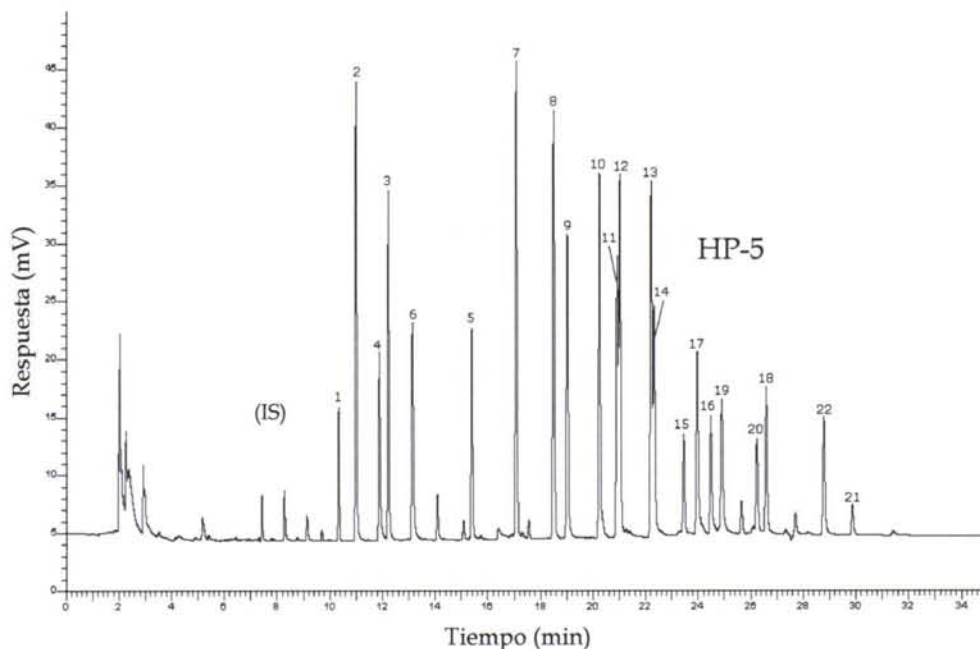


Figura III-6. Cromatogramas obtenidos con las columnas estudiadas en el equipo Autosystem XL. Lista de compuestos en la figura III-4.

Debido a los problemas de sangrado que presenta la columna 007-608 de Quadrex y con objeto de prolongar el tiempo de vida del ECD se ha ensayado una columna de bajo sangrado frecuentemente empleada para el análisis de pesticidas. El estudio de la columna **DB-35MS** se llevó a cabo en el cromatógrafo Autosystem XL. La mejor separación se consiguió empleando un flujo de gas portador de 1.0 mL/min y con el programa de temperatura que se muestra en el cromatograma de la figura III-7, siendo las demás condiciones del equipo las que se presentan en la tabla III-3.

Tabla III-3. Condiciones cromatográficas empleadas en el estudio de la separación con la columna DB-35 MS.

F Helio (portador)	T detector	T inyector	F N2 (detector)	F <i>split</i>	t <i>apertura split</i>
1 mL/min	350°C	300°C	30 mL/min	7.7 mL/min	1.2 min

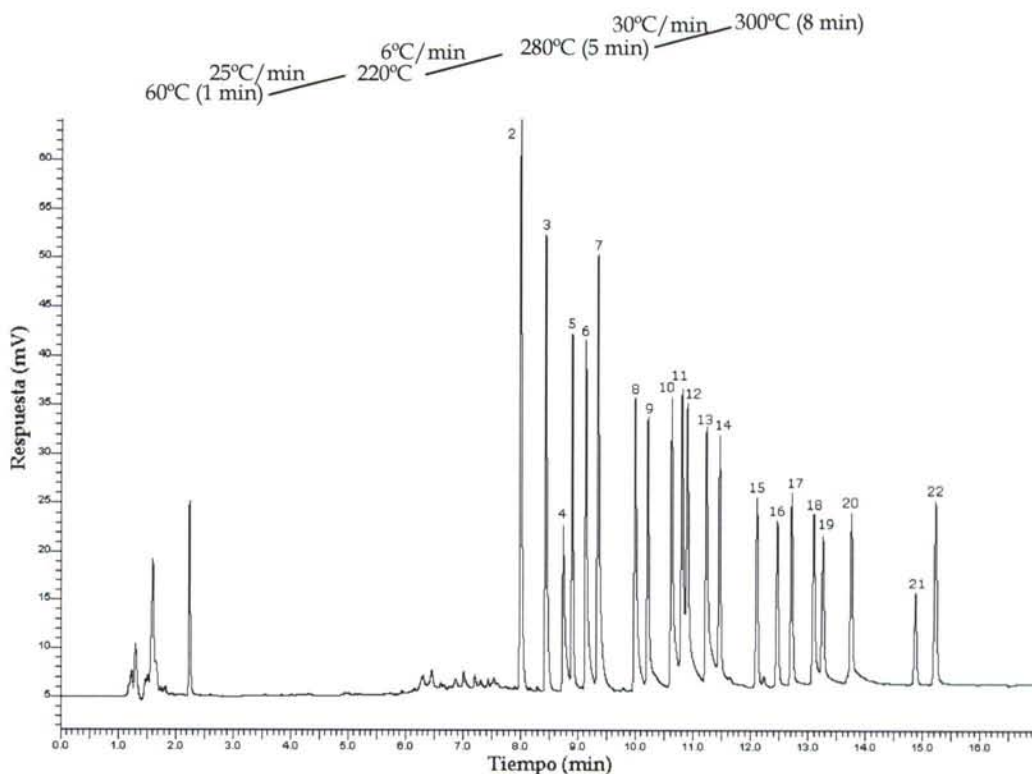
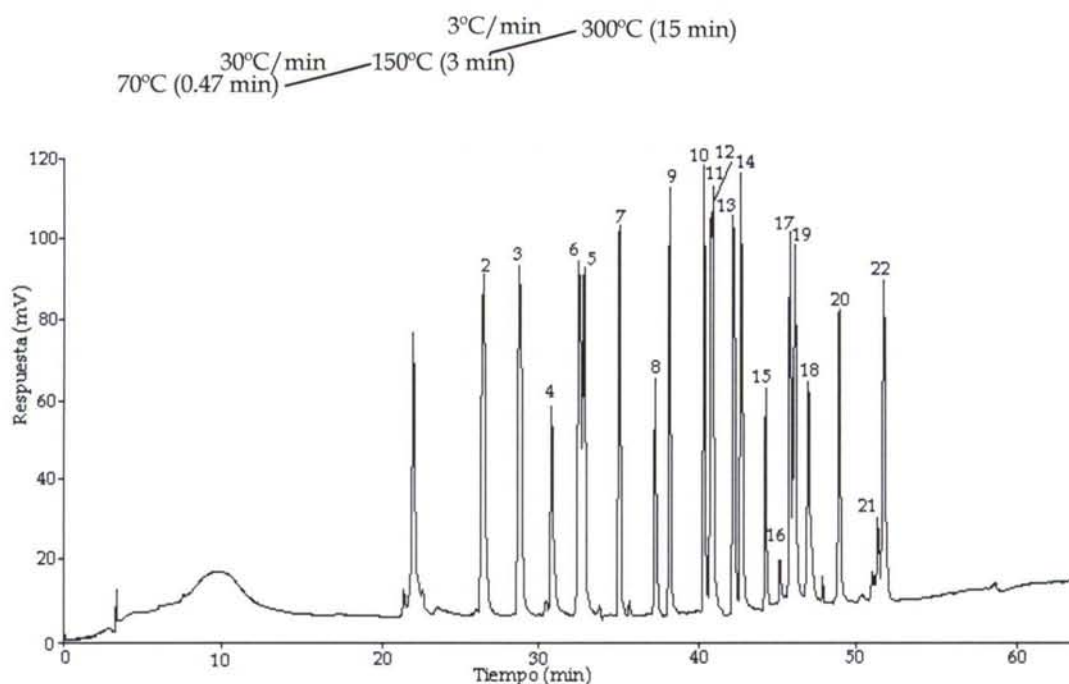


Figura III-7. Condiciones con las que se obtiene la mejor separación con la columna DB-35MS. Lista de compuestos en la figura III-4.

Por último la columna **DB-XLB** se empleó en el estudio de la inyección *on-column* de gran volumen. Debido al elevado volumen utilizado en este tipo de inyección (100 μ L) la separación de los compuestos no sólo depende del programa del horno cromatográfico, sino que se ve seriamente afectada por los parámetros de inyección. Por este motivo la optimización de la separación con esta columna se mostrará más detalladamente en el apartado dedicado a la optimización de dicho inyector. Las condiciones cromatográficas seleccionadas se recogen en la tabla III-4. El programa de temperatura escogido así como el cromatograma obtenido se muestran en la figura III-8.

Tabla III-4. Condiciones cromatográficas con las cuales se obtuvo el cromatograma de la figura III-8 con la columna DB-XLB.

P inicial	T inicial del horno	V inyección	V inyección	F columna	t apertura SVE
129 kPa	70°C	7 μ L/s	100 μ L	1.5 mL/min	45 s

**Figura III-8.** Condiciones con las que se obtiene la mejor separación con la columna DB-XLB con el inyector LVOCI. Lista de compuestos en la figura III-4.

4. INYECCIÓN SPLIT/SPLITLESS

4.1. Estudio de las condiciones de inyección

Este estudio fue realizado en un cromatógrafo de gases PE 8700 con detector ECD que cuenta con inyector *split/splitless* e inyector automático. La columna empleada en este caso es la Quadrex 007-608 en las condiciones descritas anteriormente. Se ha utilizado un *liner* de 1 mm de diámetro interno sin relleno, adecuado para la inyección en modo *splitless*.

Las variables que influyen en la inyección *splitless* son bien conocidas: temperatura del inyector, flujo de *split* y tiempo de purga. Estos factores han sido estudiados mediante un análisis univariante.

Temperatura del inyector

Afecta directamente a la vaporización de los analitos. Se ha estudiado su efecto sobre la respuesta, fijando los otros dos parámetros en flujo de *split* 18.3 mL/min y tiempo de purga 1 min. Las temperaturas ensayadas son 260°C, 280°C y 300°C.

Para llevar a cabo la interpretación de los datos se ha escogido un compuesto representativo de cada grupo de pesticidas (en función de su volatilidad). Para los compuestos cuyo tiempo de retención está comprendido entre los tiempos de α -HCH y aldrín se ha escogido el heptacloro. Para el segundo grupo, entre isodrín y dieldrín el compuesto seleccionado es el γ -clordano. El p,p'-DDT es el elegido para los compuestos comprendidos entre el endrín y el endosulfán sulfato. Por último se escoge el endrín cetona como representativo de los dos compuestos más pesados. En la figura III-9 se presenta la variación del área de cada compuesto seleccionado con la temperatura del inyector.

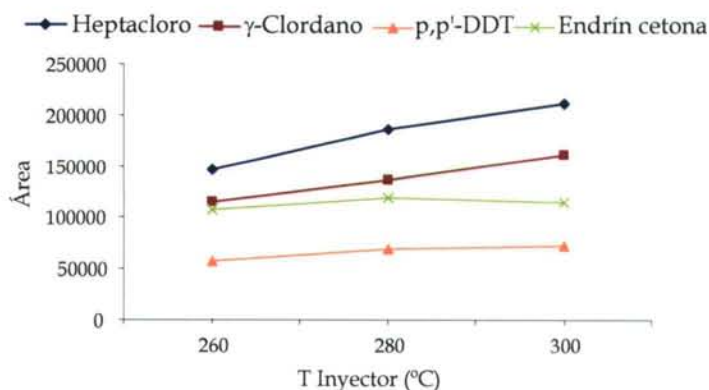


Figura III-9. Variación de la respuesta en la inyección *split/splitless* con la temperatura del inyector.

A la vista de los resultados se puede comprobar que la variación de la temperatura del inyector afecta más a los compuestos más ligeros (su respuesta aumenta al aumentar la temperatura) que a los más pesados, para los cuales apenas se observa variación. Por tanto, la temperatura de inyección seleccionada es de 300°C.

Flujo de split y tiempo de purga

Durante la inyección en *splitless* se produce la preconcentración de la muestra por efecto disolvente. La válvula de *split* está cerrada en el momento en el que se produce la inyección, y el horno se encuentra a una temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente. La cantidad del disolvente que se elimina, y por tanto el efecto de concentración conseguido, depende del grado de apertura de la válvula (flujo de *split*) y del momento en el cual se produzca la apertura de la misma (tiempo de purga) [Baugh, 1993].

A continuación en la figura III-10 se muestra la variación de la respuesta (área) con el flujo de *split* a distintos tiempos de purga para los compuestos representativos antes citados.

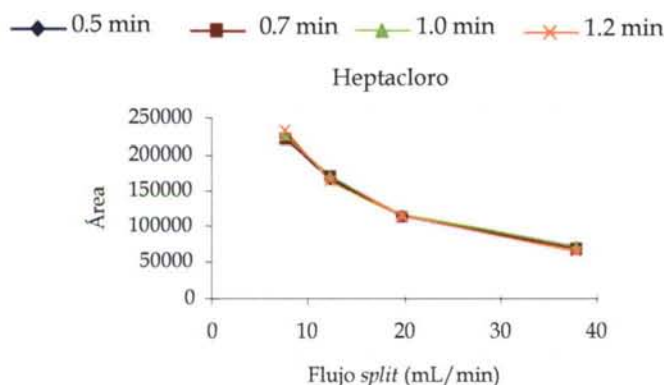


Figura III-10. Variación de la respuesta en la inyección *split/splitless* con el flujo de *split* y el tiempo de purga (continúa).

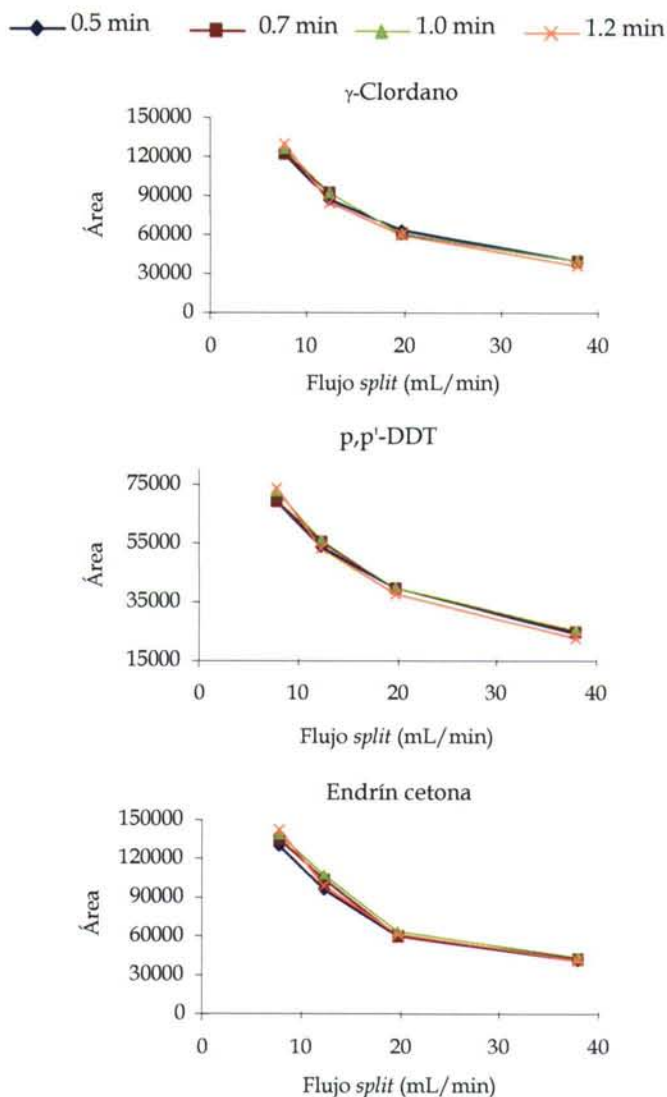


Figura III-10. Variación de la respuesta en la inyección *split/splitless* con el flujo de *split* y el tiempo de purga.

El comportamiento observado es similar para los 4 compuestos seleccionados. El área de los picos disminuye al aumentar el flujo de *split*. La variación producida sobre la señal al variar el tiempo de purga es mayor cuanto menor es el flujo de *split*. La máxima respuesta se obtiene para un flujo de 7.7 mL/min y un tiempo de purga de 1.2 min.

En la tabla siguiente se resumen las condiciones seleccionadas para el inyector *split/splitless*.

Tabla III-5. Condiciones seleccionadas para la inyección *split/splitless*.

P Helio (portador)	T detector	T inyector	F N2 (detector)	F <i>split</i>	t apertura <i>split</i>
18 psig	350°C	300°C	57 mL/min	7.7 mL/min	1.2 min

4.2. Características analíticas del método

Se han calculado las características analíticas de este modo de inyección para el cromatógrafo de gases PE 8700 con detector ECD.

La cuantificación de los pesticidas se realiza con el método del patrón interno, pues de este modo se consigue una mayor precisión ya que se reducen incertidumbres debidas a la inyección de la muestra. Inicialmente en este estudio se emplearon 2 patrones internos, TCMX y DCBF, sin embargo este último se descartó posteriormente a causa de las interferencias aparecidas en su zona cromatográfica cuando se inyectaron muestras.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) instrumentales ($\mu\text{g/mL}$) se calculan como $\bar{x}_b + 3s_b$ y $\bar{x}_b + 10s_b$ respectivamente, siendo \bar{x}_b el valor medio del blanco y s_b su desviación estándar [Miller y Miller, 1993]. Además se ha calculado el rango lineal, que abarca desde el límite de cuantificación hasta el valor que se muestra en la tabla III-6.

Tabla III-6. Límites de detección (LD), cuantificación (LC) y rango lineal ($\mu\text{g/L}$) para la inyección *splitless*-GC-ECD.

Pesticidas	LD ($\mu\text{g/L}$)	LC ($\mu\text{g/L}$)	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)
α -HCH	0.065	0.172	100
β -HCH	0.176	0.464	200
γ -HCH	0.074	0.195	150
δ -HCH	0.078	0.505	200
Heptacloro	0.085	0.225	200
Aldrín	0.075	0.198	200
Isodrín	0.080	0.211	200
Heptaclorepóxido	0.090	0.236	200
γ -Clordano	0.090	0.236	200
α -Clordano	0.091	0.241	250
α -Endosulfán	0.100	0.264	200
p,p'-DDE	0.099	0.262	200
Dieldrín	0.102	0.270	500
Endrín	0.143	0.376	250
β -Endosulfán	0.128	0.336	150
p,p'-DDD	0.160	0.424	250
Endrín aldehído	0.171	0.451	150
Endosulfán sulfato	0.155	0.408	500
p,p'-DDT	0.196	0.517	250
Endrín cetona	0.128	0.336	500
Metoxicloro	0.528	1.394	500

Se ha estudiado también la precisión instrumental para la inyección en *splitless* empleando inyector automático. Para ello se preparó un patrón con una concentración de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ de los analitos y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ del patrón interno TCMX.

Se calcula la repetibilidad (A) realizando 12 inyecciones consecutivas del patrón, y la reproducibilidad (B) con la medida de un mismo patrón en 6 días alternos a lo largo de un mes. Las desviaciones estándar relativas (%) que se obtienen se muestran en la tabla III-7.

Tabla III-7. Repetibilidad (A) y Reproducibilidad (B) expresadas en desviación estándar relativa (%) de la inyección *splitless*-GC-ECD.

Pesticidas	A	B	Pesticidas	A	B
α -HCH	0.65	4.2	p,p'-DDE	1.7	5.4
β -HCH	0.58	7.4	Dieldrín	1.8	5.0
γ -HCH	0.76	5.1	Endrín	1.9	4.4
δ -HCH	1.7	5.2	β -Endosulfán	1.5	7.4
Heptacloro	0.85	8.3	p,p'-DDD	1.7	6.5
Aldrín	0.84	3.7	Endrín aldehído	2.3	3.5
Isodrín	0.89	7.1	Endosulfán sulfato	2.1	6.6
Heptaclorepóxido	1.3	3.8	p,p'-DDT	1.9	5.7
γ -Clordano	1.4	4.2	Endrín cetona	1.9	5.5
α -Clordano	1.2	6.7	Metoxicloro	1.4	12
α -Endosulfán	2.0	5.0			

5. INYECCIÓN *SPLIT/SPLITLESS* CON TEMPERATURA PROGRAMADA Y DETECCIÓN MS (PSS-GC-MS)

La espectrometría de masas resulta una técnica muy útil en la detección de pesticidas organoclorados debido a la posibilidad de obtener información cualitativa de los compuestos y confirmar la identidad de los picos. Sin embargo, en ocasiones, la sensibilidad de este método de detección no es suficiente para determinar este tipo de compuestos a los niveles requeridos por una legislación cada vez más estricta.

Con el fin de mejorar los límites de detección para este sistema se ha empleado un inyector con temperatura programada (PSS, *programmed split/splitless*), que nos permite inyectar mayores volúmenes de muestra. En este

tipo de inyección influyen numerosas variables, por lo que se ha llevado a cabo una optimización multivariante de las mismas para nuestro caso particular.

5.1. Estudio de las condiciones de inyección

La optimización de las condiciones de inyección se ha llevado a cabo en el cromatógrafo de gases PE Autosystem, que cuenta con inyector PSS que se ha empleado operando en modo de "eliminación del disolvente". La columna utilizada en este caso es la HP-5 en las condiciones seleccionadas en el apartado 3.

Como detector se emplea un espectrómetro de masas PE Q-Mass 910 operando en impacto electrónico y modo SIM (*selected ion monitoring*), siendo las masas de cuantificación (ión cuant) y confirmación (ión conf) de cada compuesto las que se muestran en la tabla III-8.

Tabla III-8. Condiciones de trabajo GC-MS modo SIM.

Pesticidas	t _R (min)	Ión Cuant	Ión Conf	Pesticidas	t _R (min)	Ión Cuant	Ión Conf
α-HCH	7.99	181	219	p,p'-DDE	18.23	246	318
β-HCH	8.78	181	219	Dieldrín	18.28	263	237
γ-HCH	9.02	181	219	Endrín	19.36	263	-
δ-HCH	10.04	181	219	β-Endosulfán	20.02	195	-
Heptacloro	11.69	272	237	p,p'-DDD	20.53	235	-
Aldrín	13.21	263	293	Endrín aldehído	20.86	67	-
Isodrín	14.55	193	263	Endosulfán sulfato	22.19	272	237
Heptachlorepóxido	15.06	353	237	p,p'-DDT	22.64	235	165
γ-Clordano	16.24	373	237	Endrín cetona	25.74	67	317
α-Clordano	16.90	373	-	Metoxicloro	26.05	227	-
α-Endosulfán	16.90	237	241				

El voltaje de ionización es de 70 eV, la temperatura de la línea de transferencia es de 290°C, la temperatura de la fuente 240°C y el voltaje del multiplicador 1700 V.

5.2. Identificación de las variables significativas

Son varios los factores que pueden afectar a la eficacia de la vaporización. Algunos de ellos no se estudiaron en este trabajo, sino que se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios anteriores realizados en el Departamento de Química Analítica [Miñones-Vázquez y cols., 2001]. Estos factores y los valores elegidos son los siguientes:

- Longitud de la aguja de inyección: 7 cm.
- Velocidad de inyección: normal (aproximadamente 1 segundo).
- Diámetro interno del *liner* de cuarzo: 2 mm.

Se han ensayado varios volúmenes de inyección antes de llevar a cabo la optimización de los demás parámetros. El volumen de inyección elegido es de 20 μL ya que éste es el máximo ensayado que no produce desdoblamiento de los picos en una única inyección. Algunos autores han inyectado volúmenes mayores mediante múltiples inyecciones de pequeños volúmenes, como la inyección de 40 μL en 8 inyecciones [Hada y cols., 2000] o 100 μL en 10 inyecciones [Wylie, 1997].

Los factores que se optimizaron en este estudio son los siguientes:

- Velocidad de la rampa de calentamiento del inyector.
- Flujo de *split*.
- Tiempo de evaporación del disolvente: momento en el cual la válvula de *split* se cierra una vez que ya se eliminó el disolvente.
- Tiempo de transferencia de los analitos a la columna: momento en el cual la válvula de *split* se abre de nuevo.
- Temperatura inicial del inyector.
- Presencia o ausencia de relleno en el *liner* (lana de vidrio silanizada).

Para estudiar cuáles de estos factores afectan a la eficacia de la evaporación para los pesticidas estudiados se ha llevado a cabo un diseño Plackett-Burman $2^7 \times 3/32$ aleatorio con el programa estadístico Statgraphics Plus

4.0 para Windows. Asimismo se ha incluido una variable fantasma que nos ayudará a comprobar si se han producido errores experimentales.

Los valores máximos y mínimos para cada variable se han escogido teniendo en cuenta los conocimientos previos del sistema cromatográfico y las características de los compuestos a analizar (tabla III-9).

Tabla III-9. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño experimental para la inyección PSS-GC-MS.

	Factores	Mínimo	Máximo	Unidades
A	Relleno	NO	SÍ	
B	Velocidad rampa inyector	100	200	°C/min
C	Flujo de <i>split</i>	10	100	mL/min
D	Tiempo evaporación disolvente	0.1	0.8	min
E	Tiempo de transferencia	1.0	5.0	min
F	Temperatura inicial inyector	50	80	°C
G	Variable fantasma	-	+	

A continuación se obtiene la matriz del diseño experimental (tabla III-10), que indicará el valor que debe tomar cada variable en cada experimento.

Tabla III-10. Matriz del diseño experimental para la inyección PSS-GC-MS.

Experimento	A	B	C	D	E	F	G
1	SÍ	200	100	0.1	5	80	-
2	NO	100	100	0.8	5	50	+
3	NO	200	10	0.1	1	80	+
4	SÍ	200	10	0.8	1	50	-
5	SÍ	100	100	0.1	1	50	+
6	NO	100	10	0.8	5	80	-
7	NO	200	100	0.1	5	50	-
8	SÍ	100	100	0.8	1	80	-
9	NO	200	100	0.8	1	80	+
10	SÍ	200	10	0.8	5	50	+
11	NO	100	10	0.1	1	50	-
12	SÍ	100	10	0.1	5	80	+

Para cada experimento se inyectó 6 veces un patrón de todos los pesticidas de 0.4 µg/mL. Se usó una concentración tan elevada para que los picos puedan integrarse adecuadamente incluso en aquellos experimentos en los que las condiciones son más desfavorables, y proporcionan una menor respuesta. El análisis de los resultados (medidos en área) se realiza mediante la representación de las cartas Pareto para P=95%. En estas cartas la longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, que es el efecto estimado dividido por su error estándar, y es equivalente a computar una t estadística para cada efecto. Cuando una barra tenga una longitud tal que sobrepase la línea vertical que atraviesa la gráfica, el efecto correspondiente tendrá una influencia estadísticamente significativa sobre la respuesta con un 95% de confianza.

El análisis de las cartas Pareto que se obtienen para cada compuesto muestra que para todos los compuestos estudiados, excepto heptacloro y p,p'-DDT, se obtiene como variable significativa el tiempo de transferencia (E) (momento en el cual los analitos se transfieren a la columna y se vuelve a abrir la válvula de *split*), teniendo además esta variable una influencia positiva sobre la respuesta (signo del efecto estimado), esto es, a mayor tiempo de transferencia mayor área tienen los picos. Además, se han obtenido también como variables significativas el flujo de *split* (C), y la presencia o ausencia de relleno en el *liner* (A), excepto para los pesticidas que presentan volatilidades intermedias (zona central del cromatograma). Como un ejemplo se muestran las cartas Pareto obtenidas para dos de los compuestos estudiados en la figura III-11.

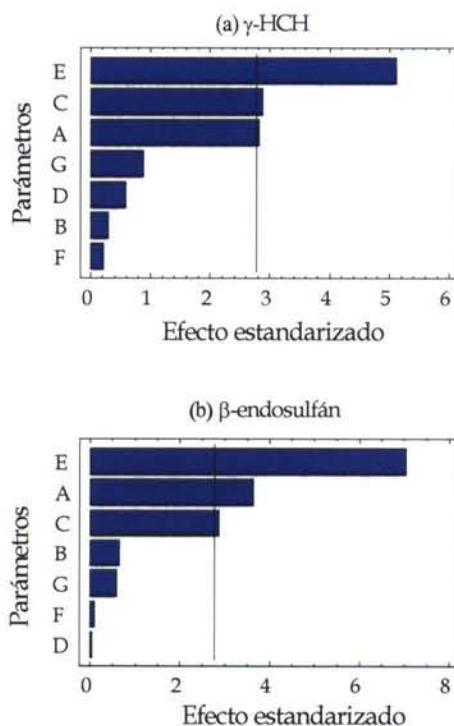


Figura III-11. Cartas Pareto obtenidas para (a) γ -HCH y (b) β -endosulfán (inyección PSS-GC-MS).

Además se obtiene el efecto estimado para cada variable, donde el signo del mismo indica la influencia positiva o negativa de la variable sobre la respuesta. Cuanto mayor sea el valor absoluto del efecto estimado mayor será la influencia de la variable sobre la respuesta. A modo de ejemplo, en la tabla III-11 se muestran los efectos estimados para γ -HCH y β -endosulfán.

Tabla III-11. Efectos estimados para γ -HCH y β -endosulfán (PSS-GC-MS).

Factores		γ -HCH	β -endosulfán
A	Relleno	-0.3062	-0.3401
B	Velocidad rampa inyector	0.0304	-0.0586
C	Flujo de <i>split</i>	-0.3132	-0.2670
D	Tiempo evaporación disolvente	-0.0615	-0.0016
E	Tiempo de transferencia	0.5576	0.6595
F	Temperatura inicial inyector	0.0218	0.0066
G	Variable Fantasma	0.0946	-0.0528

Para comprobar la existencia de posibles interacciones entre las variables y con el fin de facilitar la interpretación de la confusión de efectos, se han eliminado aquellos factores cuyo efecto estandarizado era menor y se estudian las interacciones entre los restantes efectos mediante la representación de las cartas Pareto de segundo orden. Ninguna de las posibles interacciones ha resultado ser estadísticamente significativa (figura III-12).

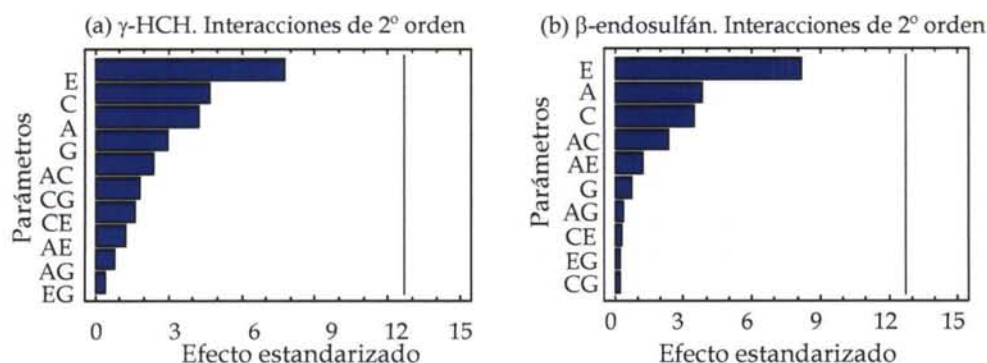


Figura III-12. Cartas Pareto de segundo orden obtenidas para (a) γ -HCH y (b) β -endosulfán (inyección PSS-GC-MS).

Como las variables que resultaron ser no significativas no tienen influencia sobre la respuesta, sus valores se han escogido de acuerdo a criterios de ahorro de reactivos, de tiempo, o una mejora del aspecto del cromatograma. Así, una elevada velocidad de la rampa de calentamiento del inyector proporciona una mejor forma de pico y por este motivo se seleccionó una velocidad de rampa de 200°C/min. El tiempo de evaporación del disolvente se fijó en 0.1 min y la temperatura inicial del PSS en 80°C.

En cuanto a la presencia o ausencia de lana de vidrio en el *liner*, que resultó ser significativa para algunos pesticidas, y a pesar de que la respuesta es mayor cuando se emplea un *liner* vacío, los picos que se obtienen están deformados y la reproducibilidad es peor, por lo que se ha preferido utilizar un *liner* relleno, que proporciona formas de pico más adecuadas y una mejor separación, como se puede apreciar en la figura III-13.

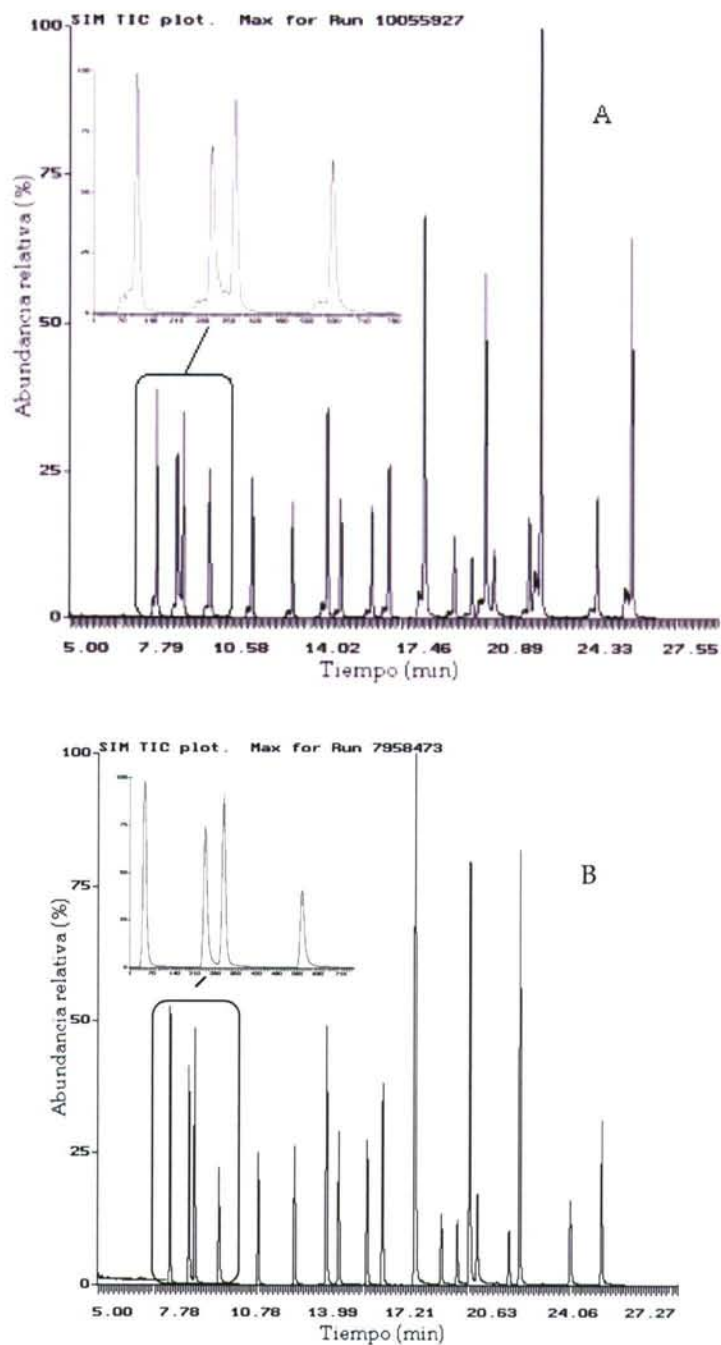


Figura III-13. Cromatogramas obtenidos usando un *liner* vacío (A) o relleno con lana de vidrio (B) en la inyección PSS-GC-MS.

5.3. Optimización de las variables significativas

De las tres variables que resultaron ser estadísticamente significativas ya se ha escogido el empleo de *liner* relleno con lana de vidrio por las razones antes expuestas. Para encontrar los valores que proporcionan una mayor respuesta de los otros dos factores, flujo de *split* y tiempo de transferencia, se realiza un diseño compositivo centrado $2^2 + star$. Fue necesario realizar un ajuste del valor mínimo (20 mL/min) y máximo (90 mL/min) del flujo de *split* para evitar que alguno de los experimentos proporcionados por el diseño implicara flujos de *split* negativos, dado que además de los experimentos en los cuales las variables toman el valor mínimo o máximo fijados, en ciertos experimentos estas variables toman un valor superior al máximo o inferior al mínimo.

En la tabla III-12 se muestran los 10 experimentos aleatorios con 4 grados de libertad que resultan del diseño.

Tabla III-12. Tabla del diseño compositivo centrado para la optimización del inyector PSS-GC-MS.

Experimento	C	E
	Flujo de <i>split</i> (mL/min)	Tiempo de transferencia (min)
1	104.5	3
2	20	5
3	5.5	3
4	90	5
5	55	0.17
6	20	1
7	55	5.8
8	55	3
9	90	1
10	55	3

Los resultados de estos experimentos (6 réplicas de cada experimento) se analizaron mediante la representación de las superficies de respuesta.

La *metodología de superficies de respuesta*, es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés, en nuestro caso el área de pico, recibe la influencia

de diversas variables y donde el objetivo es optimizar dicha respuesta. Una superficie de respuesta es, la representación gráfica de la respuesta en función de uno o más factores e indica los valores óptimos para cada variable del sistema.

En este caso las superficies de respuesta obtenidas son similares para todos los pesticidas estudiados. La respuesta aumenta cuanto mayor es el tiempo de transferencia, mientras que al aumentar el flujo de *split* la respuesta disminuye. El valor óptimo para las dos variables será aquel que al ser aplicado simultáneamente proporcione la máxima respuesta. Como ejemplo se muestran en la figura III-14 las superficies de respuesta obtenidas para γ -HCH (lindano) y β -endosulfán.

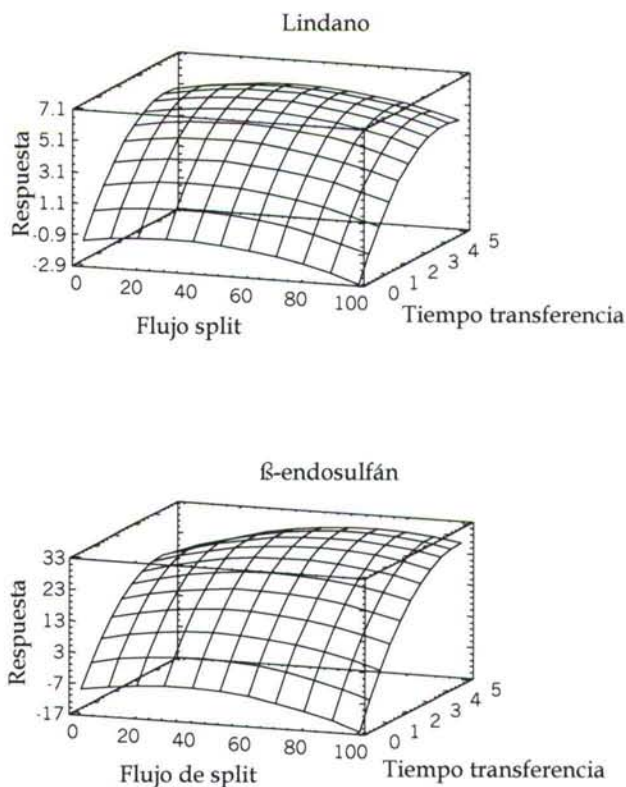


Figura III-14. Superficies de respuesta obtenidas para γ -HCH (lindano) y β -endosulfán (PSS-GC-MS).

Los valores óptimos obtenidos para cada pesticida son los que se muestran en la tabla III-13.

Tabla III-13. Valores óptimos del flujo de *split* (mL/min) y tiempo de transferencia (min) para cada compuesto en la inyección PSS-GC-MS.

Pesticidas	Flujo de <i>split</i>	Tiempo de transferencia	Pesticidas	Flujo de <i>split</i>	Tiempo de transferencia
α -HCH	46.7	4.2	p,p'-DDE	62.0	4.6
β -HCH	48.1	4.2	Dieldrín	54.6	4.4
γ -HCH	39.6	4.2	Endrín	64.8	4.8
δ -HCH	41.2	4.2	β -Endosulfán	65.2	4.5
Heptacloro	34.6	4.1	p,p'-DDD	57.8	4.7
Aldrín	40.4	4.3	Endrín aldehído	57.3	4.3
Isodrín	42.8	4.3	Endosulfán sulfato	55.1	4.7
Heptaclorepóxido	43.7	4.1	p,p'-DDT	49.1	4.4
γ -Clordano	30.9	4.4	Endrín cetona	56.5	4.2
α -Clordano	37.5	4.3	Metoxicloro	54.6	5.2
α -Endosulfán	54.4	4.2			

El tiempo de transferencia óptimo es muy similar para todos los compuestos escogiéndose, por tanto, un valor intermedio de 4.5 min para todos ellos. Este valor concuerda con el signo positivo que se obtenía en el efecto estimado. En cuanto al flujo de *split*, para los compuestos menos volátiles (a partir del α -endosulfán) los flujos de *split* óptimos son más elevados, probablemente debido a que se produce una eliminación más eficaz del disolvente sin que haya pérdida de los analitos, mientras que para los más volátiles los flujos de *split* óptimos son más bajos. Los compuestos más pesados que salen al final del cromatograma son los que dan lugar a picos más pequeños. Por este motivo se ha optado por favorecer la respuesta de estos compuestos y así se escoge un flujo de 50 mL/min.

Las condiciones finales que se han seleccionado, así como el valor que se ha fijado para otras variables son las que se ven en la tabla III-14.

Tabla III-14. Condiciones seleccionadas para la inyección PSS-GC-MS.

Factores	Seleccionado
Relleno	Sí (lana de vidrio)
Velocidad rampa inyector	200°C/min
Flujo de <i>split</i>	50 mL/min
Tiempo evaporación disolvente	0.1 min
Tiempo de transferencia	4.5 min
Temperatura inicial inyector	80°C
Longitud de la aguja	7 cm
Diámetro interno del <i>liner</i>	2 mm
Velocidad de inyección	normal
Volumen de inyección	20 µL

5.4. Características analíticas del método

Se han calculado los límites de detección y cuantificación para la inyección PSS optimizada (tabla III-15) de acuerdo con lo descrito en el apartado 4.2.

Con objeto de comprobar la mejora de sensibilidad del método de inyección estudiado con respecto al sistema de inyección clásico *splitless* se han calculado los límites de detección y cuantificación con inyección *splitless* para este detector. Las condiciones para la inyección *splitless* son las estudiadas en el apartado anterior, aunque la temperatura del inyector se ha bajado a 290°C, para adecuar la temperatura del inyector a la de la línea de transferencia del espectrómetro de masas, ya que ésta es la temperatura máxima que soporta la línea de transferencia.

Tabla III-15. Límites de detección y cuantificación ($\mu\text{g/L}$) para la inyección PSS-GC-MS (20 μL) y *splitless*-GC-MS (1 μL).

Pesticidas	LD		LC	
	PSS	<i>Splitless</i>	PSS	<i>Splitless</i>
α -HCH	3.2	74	3.2	85
β -HCH	3.0	84	3.0	101
γ -HCH	3.4	78	3.5	91
δ -HCH	4.7	103	4.7	125
Heptacloro	7.4	306	7.5	330
Aldrín	2.3	78	2.3	83
Isodrín	2.1	10	2.1	22
Heptaclorepóxido	2.6	140	2.8	171
γ -Clordano	2.2	143	2.3	164
α -Clordano	2.2	145	2.3	185
α -Endosulfán	2.5	139	2.6	167
p,p'-DDE	1.5	66	1.6	73
Dieldrín	1.9	77	2.0	113
Endrín	5.4	54	5.9	114
β -Endosulfán	2.8	43	3.2	91
p,p'-DDD	2.9	117	3.0	121
Endrín aldehído	1.1	37	1.3	55
Endosulfán sulfato	3.4	156	4.4	214
p,p'-DDT	2.0	242	2.2	259
Endrín cetona	5.5	11	6.1	139
Metoxicloro	2.2	265	2.5	382

Como se puede ver en la tabla, utilizando la inyección PSS se obtiene una mejora importante en los límites de detección con respecto a la inyección *splitless*. Esta mejora no es igual para todos los compuestos ya que se han escogido valores óptimos de compromiso que favorecieran a la mayoría de los pesticidas

estudiados, pero que pueden no ser los más idóneos para otros. Para la mayoría de los compuestos estudiados los límites de detección que se obtienen con la inyección PSS son dos órdenes de magnitud menores que con la inyección *splitless*. Esto nos permite eliminar uno de los inconvenientes que presenta la espectrometría de masas para la detección de pesticidas, mejorando los límites de detección hasta niveles adecuados para el análisis de trazas en muestras medioambientales y permitiendo aprovechar las ventajas del detector de espectrometría de masas para la identificación de los analitos de las muestras.

La precisión instrumental evaluada estudiando la repetibilidad de 8 inyecciones consecutivas de un patrón de 0.1 µg/mL y expresada como desviación estándar relativa para la inyección PSS se muestra en la tabla III-16. Como patrón interno se ha empleado TCMX.

Tabla III-16. Precisión expresada como desviación estándar relativa (DER) para la inyección PSS-GC-MS (n=8).

Pesticidas	DER (%)	Pesticidas	DER (%)
α-HCH	2.3	p,p'-DDE	5.1
β-HCH	2.6	Dieldrín	4.8
γ-HCH	2.9	Endrín	8.9
δ-HCH	5.9	β-Endosulfán	3.8
Heptacloro	7.6	p,p'-DDD	6.9
Aldrín	3.7	Endrín aldehído	5.9
Isodrín	3.2	Endosulfán sulfato	9.4
Heptaclorepóxido	6.4	p,p'-DDT	8.1
γ-Clordano	6.8	Endrín cetona	7.1
α-Clordano	6.1	Metoxicloro	16
α-Endosulfán	3.3		

Los rangos lineales que se obtienen para los dos sistemas de inyección con el detector MS van desde el límite de cuantificación hasta 50 µg/L en el caso de la inyección PSS y hasta 2000 µg/L para la inyección *splitless*.

6. INYECCIÓN *SPLIT/SPLITLESS* CON TEMPERATURA PROGRAMADA Y DETECCIÓN ECD (PSS-GC-ECD)

Una vez que se ha conseguido mejorar los límites de detección obtenidos con el espectrómetro de masas, se ha acoplado un sistema de inyección de grandes volúmenes PSS a un detector ECD, que ya de por sí tiene una gran selectividad y sensibilidad para estos compuestos, con el fin de incrementar al máximo esta sensibilidad. De este modo se dispondrá de un método cromatográfico que permite la determinación de los pesticidas organoclorados a niveles ultratrazo, como se requiere en ciertas aplicaciones. Además se ha considerado oportuno llevar a cabo una nueva optimización del inyector, ya que éste es una versión más moderna del mismo que incluye un sistema de control neumático programado (PPC, *programmed pneumatic control*) que da una mayor versatilidad al cromatógrafo, ya que permite variar los valores de flujo de *split* y de presión en cabeza de columna durante el análisis, pudiendo así introducir nuevas variables en el estudio.

6.1. Estudio de las condiciones de inyección

Esta parte del estudio se ha llevado a cabo en un cromatógrafo PE Autosystem XL equipado con ECD, inyector PSS operando en modo de “eliminación del disolvente” y control neumático programado (PPC). En este caso se va a utilizar la columna específica Quadrex 007-608 en las condiciones citadas en el apartado 3 del presente capítulo.

6.2. Identificación de las variables significativas

Al igual que se hizo en el apartado anterior se han fijado algunos de los parámetros que intervienen en la inyección y vaporización de la muestra de acuerdo con la experiencia previa del grupo investigador. Así la longitud de la aguja de inyección (7 cm), la velocidad de inyección (normal), el volumen de muestra (20 µL) y el diámetro interno del *liner* (2 mm) serán los mismos que se emplearon para el sistema PSS-GC-MS. Por último, y teniendo en cuenta los resultados que se obtuvieron en el estudio de dicho sistema, se empleará un *liner* relleno con lana de vidrio silanizada. Dado que en el estudio anterior la

temperatura inicial del inyector resultó no ser significativa, y por lo tanto no afecta a la respuesta, se ha fijado su valor en 60°C.

Los factores que se optimizaron en este estudio son los siguientes:

- Velocidad de la rampa de calentamiento del inyector.
- Flujo de *split* 1: flujo que saldrá por la válvula de *split* cuando se elimina el disolvente, antes de que ésta se cierre para que se produzca el calentamiento.
- Flujo de *split* 2: flujo que saldrá por la válvula de *split* cuando ya se transfieren los analitos a la columna.
- Tiempo de evaporación del disolvente: momento en el cual la válvula de *split* se cierra una vez que ya se eliminó el disolvente (t_1).
- Tiempo de transferencia de los analitos a la columna: momento en el cual la válvula de *split* es abierta de nuevo (t_2), y que marca el comienzo del programa del horno.

En la tabla III-17 se muestra la relación que existe entre las variables estudiadas.

Tabla III-17. Relación entre las variables estudiadas en el sistema PSS-GC-ECD.

Tiempo (min)	0	t_1	t_2
Temperatura del horno	60°C	60°C	Comienzo del programa
Temperatura del inyector	60°C	Rampa de calentamiento	300°C
Flujo de <i>split</i>	Flujo de <i>split</i> 1	0	Flujo de <i>split</i> 2
Presión	0 psi	18 psi	18 psi

Así, según se puede ver en la tabla, en el momento en el que se produce la introducción de la muestra en el inyector éste se encuentra a 60°C, y el flujo de gas portador a través de la columna se encuentra detenido para evitar que la muestra sea arrastrada, y favorecer así la evaporación simultánea de las moléculas de cada

analito. Además, la válvula de *split* está abierta. Una vez que el inyector empieza a calentarse se cierra la válvula de *split* y se restaura la presión en la columna. La válvula de *split* volverá a abrirse en el instante en el que comience la rampa del horno.

Se ha llevado a cabo un diseño Plackett-Burman $2^7 \times 3/32$ aleatorio con el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows para estudiar el grado de significación de estas 5 variables en la respuesta.

Los valores máximos y mínimos para cada variable han sido escogidos teniendo en cuenta los conocimientos previos del sistema cromatográfico y las características de los compuestos a analizar. Además, se han incluido dos variables fantasma para completar el sistema (tabla III-18).

Tabla III-18. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño para la inyección PSS-GC-ECD.

	Factores	Mínimo	Máximo	Unidades
A	Tiempo evaporación disolvente	0.1	0.5	min
B	Tiempo de transferencia	0.6	5	min
C	Flujo de <i>split</i> 1	10	100	mL/min
D	Flujo de <i>split</i> 2	10	100	mL/min
E	Velocidad rampa inyector	50	200	°C/min
F	Variable fantasma	-	+	
G	Variable fantasma	-	+	

La matriz del diseño experimental resultante se muestra en la tabla III-19.

Tabla III-19. Matriz del diseño experimental para la inyección PSS-GC-ECD.

Experimento	A	B	C	D	E	F	G
1	0.5	0.6	100	10	50	-	+
2	0.5	5.0	100	10	200	+	-
3	0.1	0.6	100	100	200	-	+
4	0.1	0.6	10	100	200	+	-
5	0.5	5.0	10	100	200	-	+
6	0.1	5.0	10	10	50	+	+
7	0.5	0.6	10	10	200	+	+
8	0.1	5.0	100	10	200	-	-
9	0.5	5.0	10	100	50	-	-
10	0.1	5.0	100	100	50	+	+
11	0.1	0.6	10	10	50	-	-
12	0.5	0.6	100	100	50	+	-

Para cada experimento se realizaron 4 inyecciones de un patrón de 0.0025 µg/mL, y el análisis de los resultados (medidos en área) se ha llevado a cabo mediante la representación de las cartas Pareto para P=95%. Analizando estas cartas se observa que el único factor que resulta significativo para la mayoría de los compuestos es el tiempo de transferencia (B), no encontrándose ningún factor significativo para α -HCH, γ -HCH, heptacloro y aldrín.

Para determinar si existen interacciones entre variables que puedan afectar a la respuesta se eliminan aquellos factores que presentan un menor valor de efecto estimado y que por lo tanto tienen menos influencia en la respuesta, y se estudian las cartas Pareto de segundo orden obtenidas con el resto de las variables. El eliminar algunos factores va a facilitar la interpretación de los resultados. Se ha encontrado que para los compuestos más volátiles el flujo de *split* 1 (C) así como la interacción de éste con el tiempo de transferencia (B) resulta ser significativo. La influencia del flujo de *split* 1 sobre la respuesta de los compuestos más volátiles es debida a que estos compuestos pueden ser eliminados con el disolvente en esta etapa. Las interacciones de segundo orden para los compuestos más pesados muestran que la velocidad de calentamiento del inyector (E), el tiempo de transferencia (B), así como las interacciones de estos factores resultan significativos en su respuesta. Además, para algunos de ellos

también resultó estadísticamente significativa la interacción entre el tiempo de transferencia (B) y el flujo de *split* 1 (C).

Como un ejemplo representativo de los demás compuestos se muestran la cartas Pareto de primer y segundo orden obtenidas para endrín y *p,p'*- DDT en la figura III-15 y los efectos estimados que se obtienen para estos compuestos (tabla III-20).

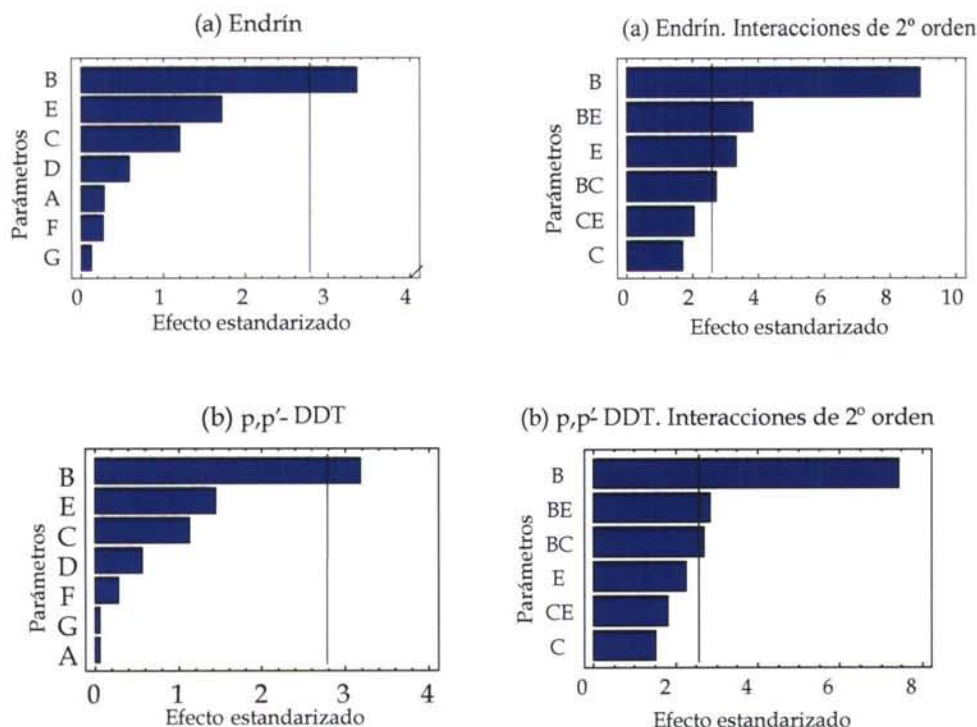


Figura III-15. Cartas Pareto de primer y segundo orden obtenidas para (a) endrín y (b) *p,p'*-DDT (inyección PSS-GC-ECD).

Como ya se ha comentado, el valor absoluto del efecto estimado es función de la influencia de la variable sobre la respuesta, y así cuanto mayor sea ésta, mayor será el efecto estimado. Por otro lado el signo del efecto estimado expresa si esta influencia sobre la respuesta es positiva o negativa, esto es, si al aumentar la variable en cuestión la respuesta aumenta (+) o disminuye (-).

Tabla III-20. Efectos estimados para endrín y p,p'-DDT (PSS-GC-ECD).

	Factores	Endrín	DDT
A	Tiempo evaporación disolvente	43133	4852
B	Tiempo de transferencia	536879	390922
C	Flujo de <i>split</i> 1	190356	137189
D	Flujo de <i>split</i> 2	-91784	-67488
E	Velocidad rampa inyector	272849	177403
F	Variable Fantasma	-41430	-32408
G	Variable Fantasma	-18167	-5008

Para las variables que resultaron ser estadísticamente no significativas se han seleccionados sus valores en función de otros criterios. Así, el flujo de *split* 2 se fija en 10 mL/min con el fin de consumir una menor cantidad de Helio, y el tiempo de eliminación del disolvente escogido es de 0.1 min.

6.3. Optimización de las variables significativas

Con las tres variables que han resultado ser significativas (tiempo de transferencia, rampa de calentamiento y flujo de *split* 1) se realiza un diseño compositivo centrado $2^3 + \text{star}$ de 16 experimentos aleatorios con 6 grados de libertad, con objeto de encontrar sus valores óptimos. Al igual que en el caso del PSS-GC-MS fue necesario realizar un ajuste de los valores mínimo y máximo de algunas de las variables para evitar valores negativos. En el caso del flujo de *split* los valores serán 30 - 100 mL/min, para el tiempo de apertura 1.5 - 5.0 min y para la velocidad de rampa del inyector 100 - 200 °C/min.

Los experimentos resultantes son los que se muestran en la tabla III-21.

Tabla III-21. Tabla del diseño composicional centrado para la optimización del inyector PSS-GC-ECD.

Experimento	B Tiempo de transferencia (min)	C Flujo de <i>split</i> 1 (mL/min)	E Velocidad de rampa del inyector (°C/min)
1	3.25	65	66
2	5.0	100	200
3	3.25	65	234
4	1.5	30	200
5	5.0	30	200
6	1.5	30	100
7	6.2	65	150
8	0.3	65	150
9	3.25	65	150
10	1.5	100	200
11	1.5	100	100
12	3.25	65	150
13	3.25	6	150
14	3.25	124	150
15	5.0	30	100
16	5.0	100	100

Los resultados de estos experimentos (4 réplicas de cada uno) se analizaron mediante las *gráficas de efectos principales*, debido a la imposibilidad de representar una única superficie de respuestas para estudiar tres variables. Esta representación muestra la respuesta estimada para cada compuesto como una función de cada factor experimental. En cada gráfica el factor se varía desde su valor más bajo hasta el más alto, mientras que los demás factores permanecen constantes en sus valores centrales.

Para la mayoría de los compuestos estudiados la gráfica que se obtiene es similar a la de la figura III-16, obteniéndose máximos bien definidos para el tiempo de transferencia (B) y la velocidad de rampa del inyector (E).

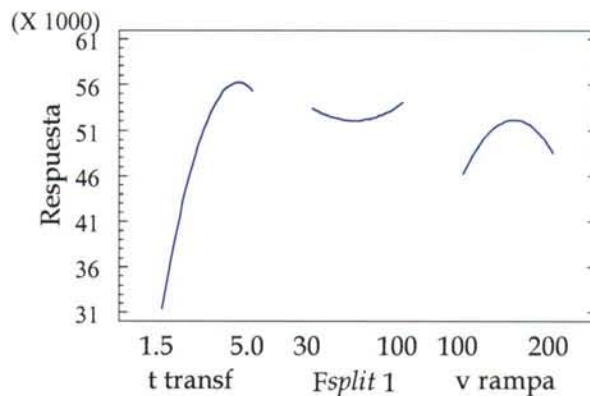


Figura III-16. Gráfica de efectos principales obtenida para β -endosulfán (PSS-GC-ECD).

Para el flujo de *split 1* (C) se obtiene una línea casi horizontal, o en algunos casos una curva en forma de U, y así, según el compuesto escogido, los óptimos coinciden con el valor más bajo de flujo o el más alto. Por este motivo para seleccionar el valor de esta variable es necesario considerar otros criterios y teniendo en cuenta que con este flujo se produce la eliminación del disolvente, se escoge un valor de 124 mL/min para favorecer esta eliminación y proteger el sistema cromatográfico, a pesar de suponer un mayor gasto de gas.

Los valores óptimos de cada variable obtenidos para cada pesticida son los que se muestran en la tabla III-22. El tiempo de transferencia finalmente elegido es de 4.9 min, por ser un valor intermedio al óptimo de cada compuesto, y la velocidad de la rampa de calentamiento del inyector se fija en 120°C/min, el más próximo a los valores medio y mediana de todos los óptimos.

Tabla III-22. Valores óptimos del flujo de *split* 1 (mL/min), tiempo de transferencia (min) y velocidad de rampa del inyector (°C/min) para cada compuesto en la inyección PSS-GC-ECD.

Pesticidas	Flujo de <i>split</i> 1	Tiempo de transferencia	Velocidad de rampa del inyector
α -HCH	6.1	4.5	136
γ -HCH	124	4.5	120
β -HCH	6.1	5.0	124
Heptacloro	6.1	6.1	79
δ -HCH	6.1	5.0	145
Aldrín	6.1	5.3	66
Isodrín	83	4.1	147
Heptaclorepóxido	6.1	4.8	130
γ -Clordano	124	4.2	141
α -Clordano	124	4.5	131
α -Endosulfán	124	4.4	134
p,p'-DDE	6.1	5.0	105
Dieldrín	124	4.2	137
Endrín	6.1	5.0	136
p,p'-DDD	6.1	5.5	110
β -Endosulfán	6.1	5.3	116
p,p'-DDT	6.1	5.7	94
Endrín aldehído	124	5.8	106
Endosulfán sulfato	6.1	4.9	147
Metoxicloro	26	6.2	79
Endrín cetona	6.1	5.3	124

En la tabla III-23 se resumen las condiciones finales escogidas para llevar a cabo la inyección en este sistema.

Tabla III-23. Condiciones seleccionadas para la inyección PSS-GC-ECD.

Factores	Seleccionado
Relleno	SÍ (lana de vidrio)
Velocidad rampa inyector	120°C/min
Flujo de <i>split</i> 1	124 mL/min
Flujo de <i>split</i> 2	10 mL/min
Tiempo evaporación disolvente	0.1 min
Tiempo de transferencia	4.9 min
Temperatura inicial inyector	60°C
Longitud de la aguja	7 cm
Diámetro interno del <i>liner</i>	2 mm
Velocidad de inyección	normal
Volumen de inyección	20 µL

6.4. Características analíticas del método

Con objeto de comprobar la mejora en los límites de detección del método de inyección estudiado con respecto al sistema de inyección clásico *splitless* se han calculado los límites de detección y cuantificación instrumentales con ambos inyectores (tabla III-24).

Tabla III-24. Límites de detección y cuantificación ($\mu\text{g/L}$) para la inyección PSS-GC-ECD (20 μL) y *splitless*-GC-ECD (1 μL).

Pesticidas	Límite de detección		Límite de cuantificación	
	PSS	<i>Splitless</i>	PSS	<i>Splitless</i>
α -HCH	0.068	3.0	0.163	3.2
γ -HCH	0.092	2.3	0.205	2.4
β -HCH	0.124	0.4	0.395	0.9
Heptacloro	0.066	0.7	0.185	0.9
δ -HCH	0.068	4.1	0.208	4.3
Aldrín	0.063	3.5	0.177	3.6
Isodrín	0.111	0.7	0.246	0.9
Heptaclorepóxido	0.026	1.1	0.152	1.3
γ -Clordano	0.076	1.8	0.196	2.0
α -Clordano	0.093	1.3	0.219	1.5
α -Endosulfán	0.057	1.8	0.177	2.0
p,p'-DDE	0.109	2.0	0.261	3.6
Dieldrín	0.071	3.6	0.205	3.8
Endrín	0.092	3.7	0.266	4.0
p,p'-DDD	0.079	4.9	0.271	5.1
β -Endosulfán	0.076	3.0	0.227	3.2
p,p'-DDT	0.135	8.0	0.395	8.3
Endrín aldehído	0.052	0.2	0.147	0.5
Endosulfán sulfato	0.086	1.0	0.241	1.3
Metoxicloro	0.357	5.9	0.824	6.6
Endrín cetona	0.101	3.5	0.237	3.7

Los límites de detección obtenidos con la inyección PSS son unas 30 veces más bajos, como valor promedio, que los obtenidos con la inyección *splitless*, e incluso llegan a mejorarse en 60 veces para algunos compuestos.

En cuanto a la precisión instrumental de la inyección PSS-GC-ECD, evaluada estudiando la repetibilidad expresada como desviación estándar relativa, los resultados obtenidos se recogen en la tabla III-25.

Tabla III-25. Precisión expresada como desviación estándar relativa (DER) para la inyección PSS-GC-ECD (n=4).

Pesticidas	DER (%)	Pesticidas	DER (%)
α -HCH	2.5	p,p'-DDE	2.7
γ -HCH	1.6	Dieldrín	2.7
β -HCH	4.5	Endrín	2.8
Heptacloro	5.2	p,p'-DDD	2.2
δ -HCH	9.1	β -Endosulfán	3.1
Aldrín	5.1	p,p'-DDT	3.5
Isodrín	4.1	Endrín aldehído	9.7
Heptaclorepóxido	2.4	Endosulfán sulfato	8.2
γ -Clordano	2.0	Endrín cetona	2.0
α -Clordano	2.0	Metoxicloro	4.9
α -Endosulfán	3.1		

Los rangos lineales que se obtienen para los dos sistemas de inyección con el detector ECD van desde el límite de cuantificación hasta 2.5 $\mu\text{g/L}$ en el caso de la inyección PSS y hasta 200 $\mu\text{g/L}$ para la inyección *splitless*.

Los límites de detección tan bajos que se han obtenido con la inyección PSS-GC-ECD permiten reducir etapas de la preparación de muestra, como la concentración de extractos por evaporación que además de alargar el proceso, en ocasiones supone una fuente de error por pérdidas de compuestos. Asimismo, permite reducir la cantidad de muestra necesaria en una extracción, lo cual es de gran interés en el caso de muestras de fluidos biológicos o en el caso de muestras acuosas, donde normalmente es necesario extraer 1 L de muestra para alcanzar los niveles requeridos por la legislación, con los consiguientes problemas de almacenamiento.

7. INYECCIÓN DE GRANDES VOLÚMENES *ON-COLUMN* Y DETECCIÓN ECD (LVOCI-GC-ECD)

Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, dentro de los inyectores de grandes volúmenes, además del inyector PSS ya estudiado, se encuentra el inyector *on-column*. En este apartado, y para completar el estudio de los inyectores de grandes volúmenes, se ha llevado a cabo la optimización de un inyector *on-column* de grandes volúmenes (LVOCI, *large volume on-column injector*) inyectando 100 μ L de muestra, lo cual permitirá el análisis de muestras muy diluidas.

Este sistema de inyección presenta gran complejidad a la hora de llevar a cabo su optimización, debido al gran número de variables que influyen en el proceso, y además porque el modo en que estas variables afectan a la eficacia de la inyección no resulta tan intuitivo como en la inyección *splitless* o en la inyección PSS.

7.1. Descripción del sistema LVOCI

El mecanismo de desolvatación de la muestra en el inyector se representa en la figura III-17.

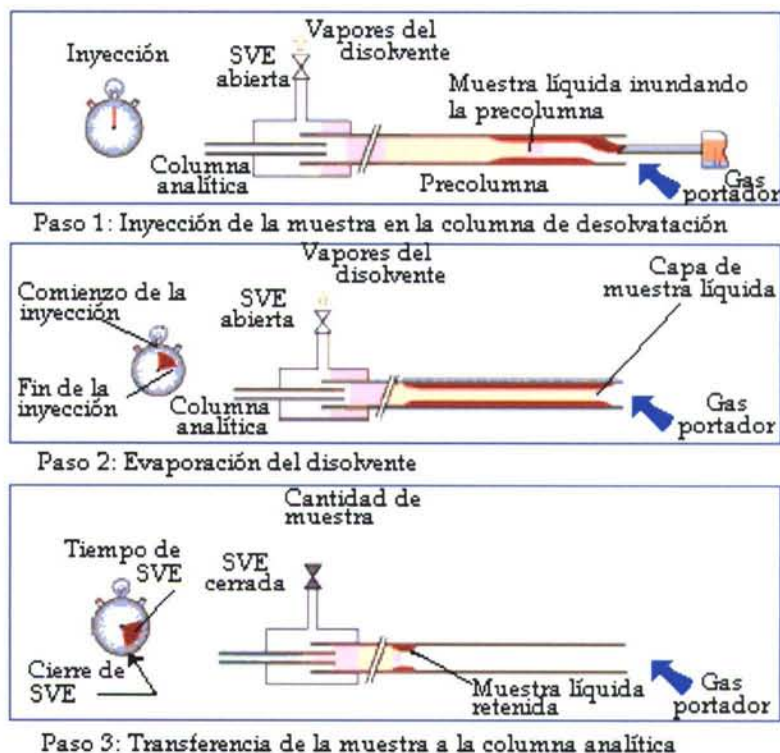


Figura III-17. Mecanismo de desolvatación de muestra en el LVOCI.

La muestra líquida se inyecta sobre una precolumna y las condiciones de temperatura y presión hacen que una parte de disolvente se evapore durante la inyección, mientras que la parte que no se evapora fluye como líquido en la precolumna formando una zona inundada (paso 1). Los vapores del disolvente formados durante la etapa de inyección son expulsados al ambiente a través de la válvula SVE (*solvent vapour exit*), situada entre la precolumna y la columna capilar analítica. En la técnica LVOCI es necesario emplear precolumnas en las que el segmento en el cual se forma la zona inundada no esté recubierto para que los efectos de disolvente se produzcan de un modo adecuado. La sección de la precolumna recubierta es la que retiene los analitos hasta que se produce la eliminación de la mayoría del disolvente y la válvula de SVE se cierra, reduciendo una eventual pérdida de sustancias volátiles durante la última fase de evaporación del disolvente (paso 2). El disolvente restante pasa a la columna de

separación y una vez que se completa la evaporación del mismo, comienza el proceso de separación cromatográfica de los analitos (paso 3).

7.2. Estudio de las condiciones de separación

Esta parte del estudio se ha llevado a cabo en un cromatógrafo Thermo Finnigan Trace GC, equipado con ECD, inyector automático AS2000 y LVOCI. En este caso se va a utilizar la columna DB-XLB. El estudio de la separación de los compuestos de interés con este sistema de inyección ha resultado complejo, debido a que la separación no sólo se ve influida por las condiciones de temperatura del horno, sino que se ha comprobado que en gran medida también se ve afectada por las condiciones de la inyección. Se ha empleado una disolución patrón de pesticidas organoclorados en acetato de etilo, ya que posteriormente este método se aplicará para la inyección de muestras de agua extraídas mediante extracción micro-líquido-líquido con este disolvente.

Inicialmente para llevar a cabo el estudio de la separación se utilizaron las condiciones de inyección que propone el fabricante para la inyección LVOC en el programa Chrom-Card, versión 2.2. Este programa dispone de una opción que permite optimizar automáticamente las condiciones de inyección, fijándole previamente el disolvente a utilizar (acetato de etilo), el volumen de inyección (100 μ L) y el volumen que deseamos que entre en la columna cromatográfica (5 μ L). Con estas condiciones, el programa establece los valores de los parámetros de inyección que se muestran en la tabla III-26.

Tabla III-26. Condiciones en las que se ha obtenido el cromatograma de la figura III-18.

P _{inicial}	T _{inicial} horno	V _{inyección}	t _{cierre} SVE	F _{columna}
130 kPa	70°C	7 μ L/s	30 s	1 mL/min

En estas condiciones se inyectó un patrón de concentración 1 μ g/L en acetato de etilo, siendo la rampa de temperatura del horno la que se muestra en la figura III-18. Como se puede observar, los compuestos empiezan a eluir muy tarde (a partir del minuto 30) y se separan mal.

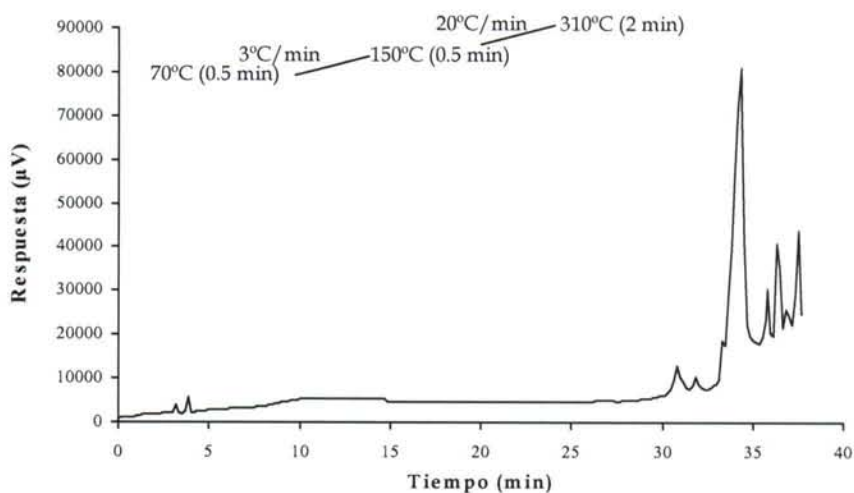


Figura III-18. Programa de temperatura del horno y cromatograma obtenido en las condiciones de LVOCI propuestas por el software del fabricante.

Realizando variaciones del programa de temperatura del horno no se consiguió mejorar la separación, por lo que se cambian tanto las condiciones del horno como las de inyección (aunque manteniendo siempre un volumen de inyección de 100 μ L). Se prueban, en lo que llamaremos ensayo 1, las siguientes condiciones de inyección (tabla III-27):

Tabla III-27. Condiciones cromatográficas del ensayo 1 (LVOCI-GC-ECD).

P_{inicial}	$T_{\text{inicial horno}}$	$v_{\text{inyección}}$	$t_{\text{cierre SVE}}$	F_{columna}
80 kPa	56°C	8 μ l/s	43 s	1.5 mL/min

Las condiciones de temperatura del horno son las que se muestran en la figura III-19, junto con el cromatograma obtenido al inyectar un patrón de 2 μ g/L en acetato de etilo.

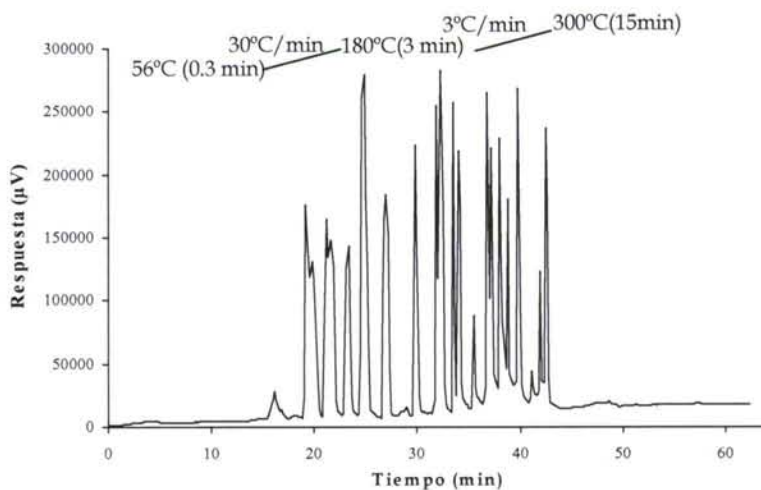


Figura III-19. Programa de temperatura del horno y cromatograma obtenido en el ensayo 1 (LVOCI-GC-ECD).

En este caso aparecen todos los compuestos estudiados, pero la separación no es satisfactoria.

En el ensayo 2 se establecen las condiciones de inyección que se muestran en la tabla III-28, y el programa de temperatura representado en la figura III-20.

Tabla III-28. Condiciones cromatográficas del ensayo 2 (LVOCI-GC-ECD).

P _{inicial}	T _{inicial} horno	v _{inyección}	t _{cierre} SVE	F _{columna}
129 kPa	70°C	7 µl/s	45 s	1.5 mL/min

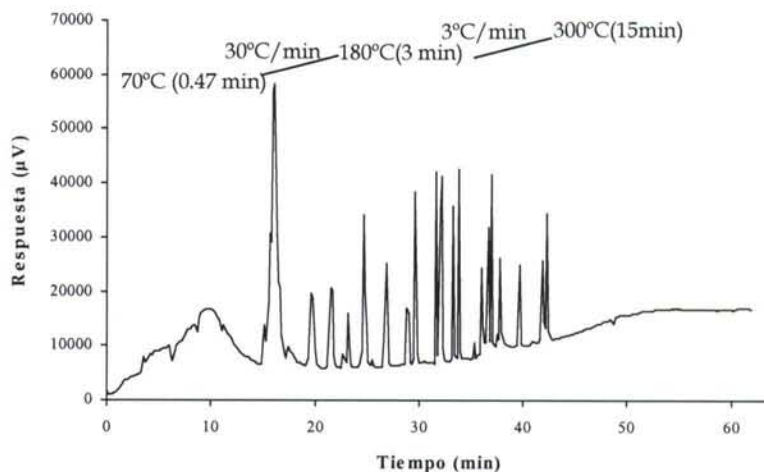


Figura III-20. Programa de temperatura del horno y cromatograma que se obtiene en las condiciones LVOCI del ensayo 2.

Empleando las mismas condiciones de la tabla III-28, se han realizado modificaciones del programa de temperatura del horno hasta llegar a las condiciones definitivas de separación con las cuales se obtiene una buena separación de los compuestos estudiados (figura III-21).

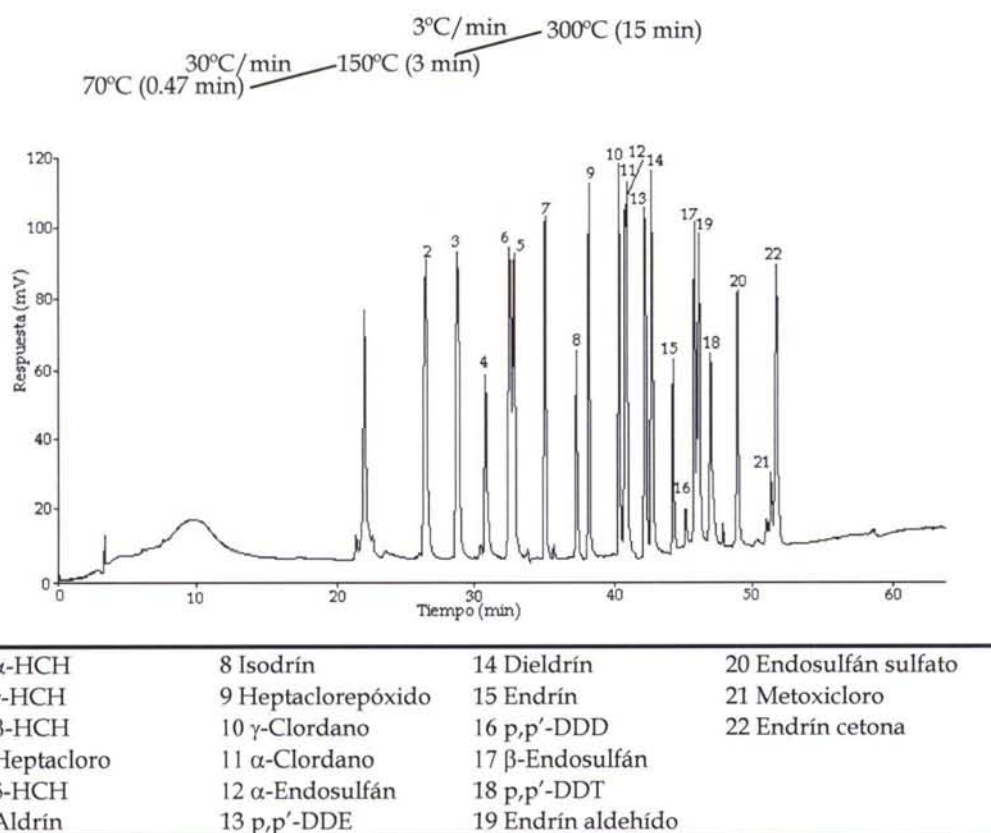


Figura III-21. Programa de temperatura del horno seleccionado y cromatograma obtenido en estas condiciones (LVOCI-GC-ECD).

7.3. Identificación de las variables significativas

Para encontrar las mejores condiciones para llevar a cabo la inyección LVOC se realiza un estudio de los parámetros que afectan a la inyección y vaporización de la muestra en este sistema. Uno de los factores más importante es el tipo de disolvente, ya que el valor óptimo de los demás factores instrumentales va a variar según el disolvente utilizado. En la mayoría de las ocasiones los disolventes empleados para llevar a cabo este tipo de inyección son hexano [Beltran y cols., 1997; Anelli y cols., 2000], o diclorometano [Crockett-Butler y cols., 1999]. En este trabajo se ha escogido el acetato de etilo como disolvente debido a la

gran solubilidad de los pesticidas organoclorados en este disolvente. Además, este disolvente es inmiscible con el agua, y menos denso, lo que facilita la separación de las fases y la posterior aplicación de este método de inyección al análisis de muestras de aguas.

Los factores que se optimizaron en este estudio son los siguientes:

- Presión inicial en la columna, que es la presión del sistema durante el tiempo que dura el proceso de inyección.
- Temperatura inicial del horno, que no debe ser muy alta en relación con la temperatura de ebullición del disolvente, ya que la muestra debe formar una capa líquida en la precolumna.
- Velocidad de inyección. Aunque en otros sistemas de inyección se ha demostrado que esta variable no afecta a la eficacia de la evaporación, en la inyección *on-column* de grandes volúmenes es una variable importante, ya que afecta a la formación de la "zona inundada". El proceso de evaporación parcial del disolvente que se produce en la precolumna requiere que la muestra se introduzca a una velocidad ligeramente superior a la de evaporación del disolvente en la misma. En el caso de que la muestra se introduzca de un modo demasiado lento puede provocar que todo el disolvente se evapore y eliminando la posibilidad de utilizar el efecto de atrapamiento del disolvente para preconcentrar la muestra y así obtener mayor sensibilidad. Por otra parte, una introducción de la muestra demasiado rápida provoca la inundación de la columna.
- Tiempo cierre de la válvula de SVE. Afecta a la eliminación del disolvente y también a los compuestos más volátiles. La válvula se debe cerrar lo más tarde posible, después de que la mayoría del disolvente haya sido eliminado, pero antes de que los componentes de interés comiencen a abandonar el sistema a través de la válvula. Cuando se emplea una precolumna con el último tramo recubierto de fase estacionaria, o cuando se produce el efecto de atrapamiento con disolvente, la película de muestra o la fase estacionaria retienen los compuestos volátiles hasta el final de la

evaporación del disolvente, permitiendo retrasar el tiempo de cierre de la válvula hasta que termine la evaporación del disolvente.

- Tiempo de isoterma inicial del horno.

Se efectúa un estudio de estas variables para inyecciones de 100 μL de patrón de pesticidas disuelto en acetato de etilo. Con el fin de determinar el grado de influencia de estas cinco variables en la respuesta, se ha realizado un diseño Plackett-Burman $2^8 \times 3/64$ aleatorio con el programa estadístico Statgraphics Plus 4.0 para Windows, para los 5 factores más 3 variables fantasma.

En una primera aproximación al problema y dado que éste es un sistema complejo, se escogieron unos valores máximos y mínimos de las variables a estudiar para tantear si eran adecuados. Los valores que se escogieron fueron los que se muestran en la tabla III-29.

Tabla III-29. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño experimental para el sistema LVOCI-GC-ECD.

	Factores	Mínimo	Máximo	Unidades
A	Presión inicial	75	180	kPa
B	Temperatura inicial	80	130	$^{\circ}\text{C}$
C	Velocidad de inyección	1	20	$\mu\text{L/s}$
D	Tiempo de cierre de SVE	10	90	s
E	Tiempo de isoterma	0.47	2	min
F	Variable fantasma	-	+	
G	Variable fantasma	-	+	
H	Variable fantasma	-	+	

Los ensayos se realizan por triplicado empleando un patrón de pesticidas organoclorados de 10 $\mu\text{g/L}$ en acetato de etilo. Al realizar la inyección del primer ensayo (tabla III-30) se ha comprobado que resulta imposible cuantificar los picos, ya que al variar las condiciones de inyección, la separación se ve afectada provocando que muchos de ellos coeluyan.

Tabla III-30. Matriz del diseño experimental 1 (LVOCI-GC-ECD).

Experimento	A	B	C	D	E	F	G	H
1	75	130	20	90	0.47	-	+	-
2	180	130	1	90	2.0	-	+	+
3	180	80	20	10	0.47	+	+	-
4	75	130	20	10	2.0	+	-	-
5	180	80	1	10	2.0	-	-	+
6	75	80	1	10	0.47	-	-	+
7	75	130	1	10	0.47	+	+	-
8	75	80	1	90	2.0	+	-	+
9	180	80	20	90	0.47	+	+	-
10	180	130	1	90	0.47	-	+	-
11	75	80	20	90	2.0	+	-	+
12	180	130	20	10	2.0	-	-	+

Para poder interpretar los resultados del estudio se escogen como representativos de los demás tres compuestos, que eluyan lo suficientemente separados como para que no se junten demasiado al variar las condiciones de inyección. Además se elige otro compuesto que eluye próximo a uno de ellos que nos servirá para evaluar cómo afectan las condiciones de inyección a la separación de los compuestos. Para los compuestos más volátiles se escoge como representativo el γ -HCH, y para los más pesados el endosulfán sulfato. En la zona intermedia del cromatograma se eligen α y γ -clordano, que eluyen próximos entre sí, y que se cuantificarán conjuntamente en todos los ensayos. La resolución de estos compuestos nos permitirá evaluar las condiciones de separación.

Después de inyectar los tres primeros ensayos no se observan diferencias entre la respuesta con unas u otras condiciones y además la señal que se obtiene para los cuatro compuestos seleccionados es muy baja y los picos deformes. Estos malos resultados pueden ser debidos a que los valores mínimos y máximos escogidos son valores demasiado extremos, siendo todas las condiciones demasiado desfavorables. Así se seleccionan unos nuevos valores máximos y mínimos para cada variable (tabla III-31).

Tabla III-31. Valores máximos y mínimos de las variables en el diseño experimental 2 para el sistema LVOCI-GC-ECD.

	Factores	Mínimo	Máximo	Unidades
A	Presión inicial	100	150	kPa
B	Temperatura inicial	80	130	°C
C	Velocidad de inyección	5	20	μL/s
D	Tiempo de cierre de SVE	25	120	s
E	Tiempo de isoterma	0.47	1.5	min
F	Variable fantasma	-	+	
G	Variable fantasma	-	+	
H	Variable fantasma	-	+	

Con estos valores se obtiene una nueva matriz de experimentos (tabla III-32). Al realizar estos ensayos sí se observaron diferencias según las condiciones aplicadas.

Tabla III-32. Matriz del diseño experimental 2 (LVOCI-GC-ECD).

Experimento	A	B	C	D	E	F	G	H
1	100	130	5	25	0.47	+	+	+
2	100	80	5	25	0.47	-	-	-
3	150	80	20	120	0.47	+	-	-
4	150	80	5	25	1.5	+	+	-
5	150	130	5	120	0.47	-	-	+
6	150	130	5	120	1.5	-	+	-
7	100	130	20	120	0.47	+	+	-
8	150	80	20	25	0.47	-	+	+
9	150	130	20	25	1.5	+	-	+
10	100	130	20	25	1.5	-	-	-
11	100	80	5	120	1.5	+	-	+
12	100	80	20	120	1.5	-	+	+

El análisis de los resultados se realiza mediante la representación de las cartas Pareto para P=95%. Con el fin de evaluar lo mejor posible el efecto de las variables sobre la respuesta de los analitos, ésta se ha medido como altura de pico y no como área. Así se evitan posibles errores de interpretación en los resultados del diseño, pues con algunos experimentos se han obtenido picos cromatográficos anchos y poco resueltos, pero que daban lugar a áreas grandes.

En la figura III-22 se muestran la cartas Pareto de primer y segundo orden obtenidas para γ -HCH, $\gamma + \alpha$ clordano y endosulfán sulfato.

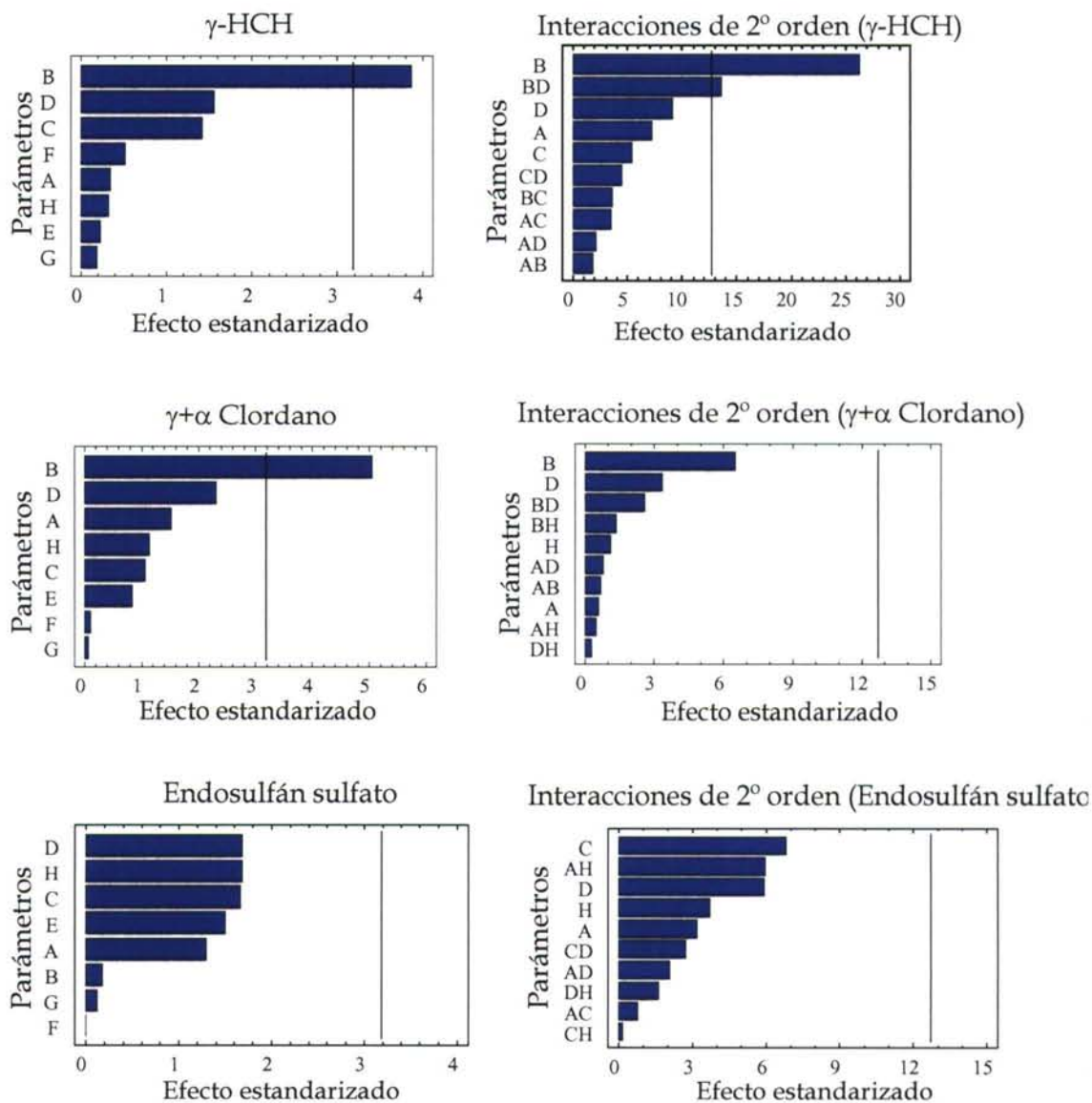


Figura III-22. Cartas Pareto de primer y segundo orden para γ -HCH, $\gamma + \alpha$ -clordano y endosulfán sulfato (LVOCI-GC-ECD).

Analizando las cartas Pareto de primer orden se comprueba que para el γ -HCH y los clordanos el único factor que resulta ser significativo y además con un gran efecto estimado, es la temperatura inicial del horno (B). Este efecto ya se había comprobado al observar los cromatogramas, ya que a temperaturas iniciales elevadas el γ -HCH se pierde completamente. Además para este compuesto resulta significativa la interacción de segundo orden entre la temperatura inicial del horno (B) y el tiempo de cierre de la válvula (D), sin embargo en el caso del endosulfán sulfato no se ha encontrado ningún factor significativo.

Cuando en un diseño de experiencias hay una variable que resulta muy significativa, puede enmascarar la significación de otras variables. Esto se puede ver en las gráficas de probabilidad normal de efectos, representadas teniendo en cuenta todas las variables (a) o eliminando la temperatura inicial del horno (b) (figura III-23). En esta gráfica se representan los efectos estandarizados asociados a cada variable ordenados en modo creciente, frente al porcentaje de frecuencia acumulada para cada una. Su premisa básica es que los efectos que no son verdaderos y las manifestaciones de ruido se comportan simplemente como si procedieran de una distribución normal centrada en cero. Estos efectos se aproximan a la línea, mientras que aquellos efectos realmente significativos se alejan de la línea. De este modo se pueden distinguir los efectos reales de aquellos que son simple ruido (no significativos).

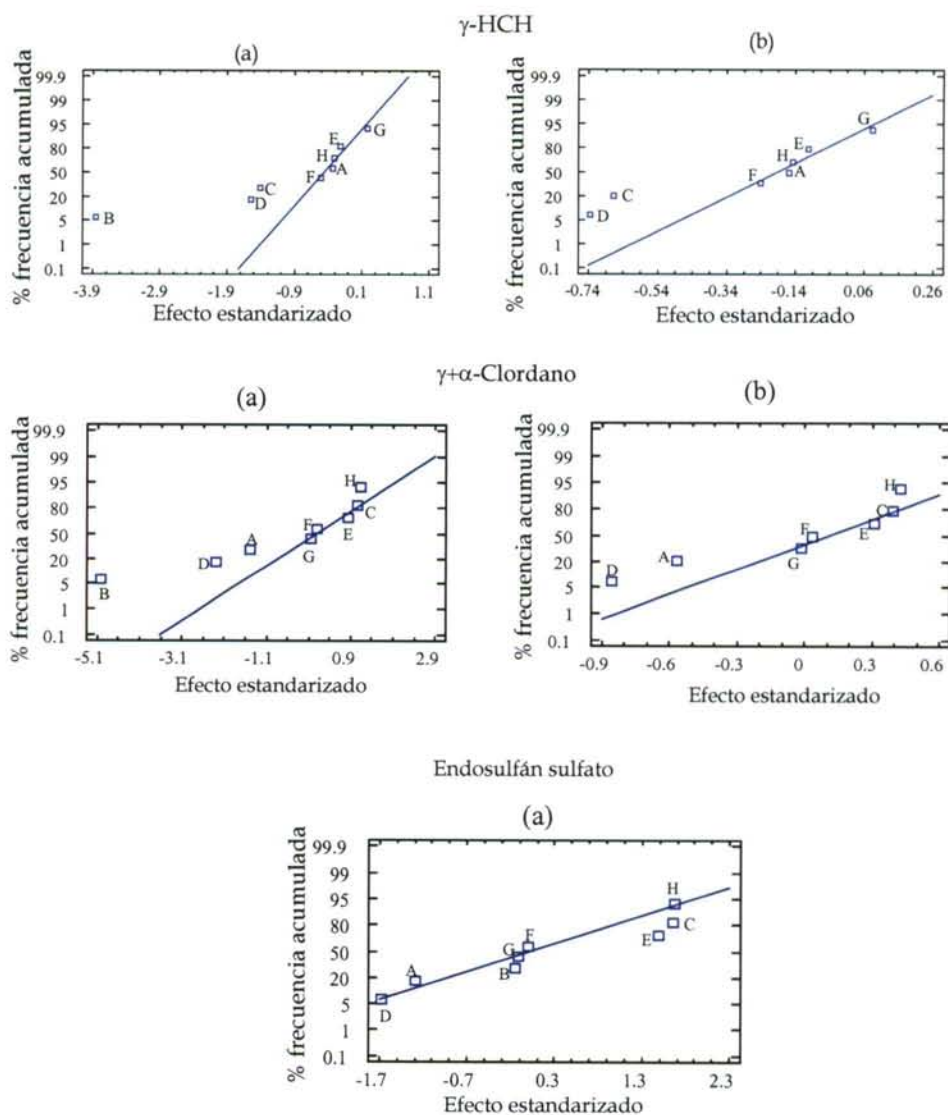


Figura III-23. Gráficas de probabilidad normal de efectos para γ -HCH, γ + α -clordano y endosulfán sulfato: (a) teniendo en cuenta todas las variables, (b) sin considerar la temperatura inicial del horno (factor B).

Como se puede ver en la figura III-23, al eliminar la temperatura (B), se observa para el γ -HCH que la velocidad de inyección (C), y el tiempo de cierre de la válvula SVE (D) también resultan ser significativos. En el caso de los clordanos

los factores D y A (presión inicial) están ligeramente separados de la línea, mientras que para el endosulfán sulfato no se ha observado ningún efecto significativo teniendo en cuenta todos los factores.

En la tabla III-33 se muestran los efectos estimados (cuya interpretación ya se ha comentado en la optimización de los inyectores PSS) obtenidos para estos tres compuestos.

Tabla III-33. Efectos estimados de orden 1 para γ -HCH, γ + α - clordano y endosulfán sulfato (LVOCI-GC-ECD).

Factores		γ -HCH	Clordanos	Endosulfán sulfato
A	Presión inicial	-2504	-8028	-4667
B	Temperatura inicial	-28644	-26856	-579
C	Velocidad de inyección	-10458	5581	5965
D	Tiempo de cierre de SVE	-11528	-12231	-6060
E	Tiempo de isoterma	-1606	4398	5376
F	Variable fantasma	-3791	497	-1
G	Variable fantasma	1327	-251	-394
H	Variable fantasma	-2332	6019	6034

7.4. Optimización de las variables

Para llevar a cabo la optimización de las variables, en este caso no se va a utilizar un diseño composicional, ya que debido a la gran influencia de las condiciones de inyección sobre la separación de los compuestos, no se puede considerar solo la respuesta sino también la separación de los mismos. Por ello se ha realizado el estudio de las variables de modo univariante.

Temperatura inicial del horno

Los valores en los que se fijaron las demás variables para llevar a cabo el estudio de la temperatura inicial del horno son los siguientes:

- Velocidad de inyección: 10 $\mu\text{L/s}$.
- Tiempo de cierre de SVE: 90 s.
- Tiempo de isoterma: 1.5 min.
- Presión inicial: 100 kPa.

El patrón de la mezcla de los pesticidas seleccionados inyectado es de 10 $\mu\text{g/L}$ en acetato de etilo. Los valores de temperatura que se ensayaron fueron valores en torno a 80°C, ya que se ha comprobado que la influencia de la temperatura es negativa, y que a temperaturas elevadas se pierden los compuestos más volátiles. Los resultados que se obtienen se muestran en la figura III-24.

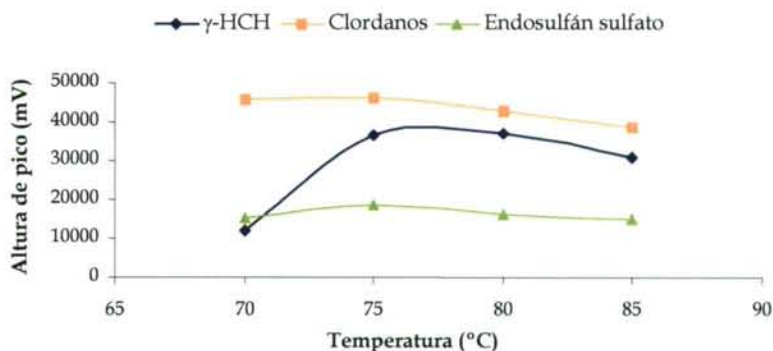


Figura III-24. Variación de la respuesta con la temperatura inicial del horno (LVOCI-GC-ECD).

A la vista de la gráfica, se comprueba que tanto para γ + α -clordano como para el endosulfán sulfato, la variación de la temperatura inicial del horno apenas tiene efecto sobre la altura de pico, como ya se había visto en las cartas Pareto. Sin embargo en el caso del γ -HCH sí se observa un incremento importante de la altura de pico al pasar de 70 a 75°C. Teniendo esto en cuenta, se escoge 75°C como la temperatura óptima de inyección.

Velocidad de inyección

Las condiciones de las variables en el estudio de la velocidad de inyección son las que se muestran a continuación:

- Temperatura inicial del horno: 75°C.
- Tiempo de cierre de SVE: 90 s.
- Tiempo de isoterma: 1.5 min.
- Presión inicial: 100 kPa.

Se han ensayado valores entre 5 y 30 $\mu\text{L/s}$ y los resultado se muestran en la gráfica de la figura III-25.

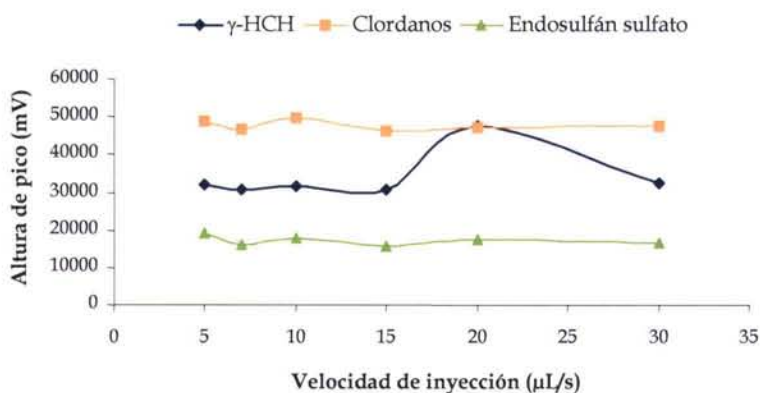


Figura III-25. Variación de la respuesta con la velocidad de inyección (LVOCI-GC-ECD).

Como se observa en la figura, apenas se aprecia variación en la respuesta tanto para γ + α -clordano como para el endosulfán sulfato. Esto concuerda con el hecho de que esta variable no había resultado ser significativa para estos compuestos. Sin embargo se obtiene una variación importante en el caso del γ -HCH, obteniéndose la máxima respuesta para este compuesto a una velocidad de inyección de 20 $\mu\text{L/s}$. Esto puede ser debido a que la velocidad de inyección influye en la formación de la zona inundada y, como ya se comentó en la introducción, el efecto de concentración por atrapamiento del disolvente (*solvent trapping*) afecta principalmente a los compuestos más volátiles. Este ensayo se

repitió para comprobar que no se trataba de un dato anómalo, y el resultado fue confirmado. Así, la velocidad de inyección se fija en 20 $\mu\text{L/s}$.

Tiempo de cierre de la válvula de SVE

A continuación se ha llevado a cabo el estudio del momento en el cual debe cerrarse la válvula de salida de vapor de disolvente (SVE). Los valores estudiados se encuentran comprendidos entre 20 y 80 s y las condiciones fijadas para el resto de las variables son:

- Temperatura inicial del horno: 75°C.
- Velocidad de inyección: 20 $\mu\text{L/s}$.
- Tiempo de isoterma: 1.5 min.
- Presión inicial: 100 kPa.

En la gráfica de la figura III-26 se puede observar que hay un ligero aumento de la respuesta para clordanos y endosulfán sulfato cuando la válvula SVE se cierra a los 60 s. A tiempos mayores, la respuesta disminuye de nuevo. Para γ -HCH la respuesta permanece prácticamente constante hasta 60 s, y a partir de ese valor disminuye ligeramente. Se selecciona un tiempo para el cierre de la válvula SVE de 60 s.

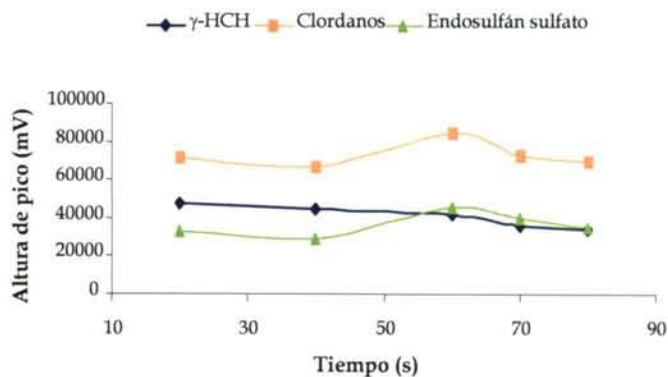


Figura III-26. Variación de la respuesta con el tiempo de cierre de la válvula de SVE (LVOCI-GC-ECD).

Presión inicial

Para estudiar la presión inicial del inyector se han tomado valores comprendidos entre 80 y 130 kPa, manteniendo el resto de los parámetros en sus valores óptimos, o en el caso del tiempo de isoterma, en el valor seleccionado inicialmente. En la figura III-27 se muestra el efecto de la presión inicial en las condiciones siguientes:

- Temperatura inicial del horno: 75°C.
- Tiempo de cierre de SVE: 60 s.
- Velocidad de inyección: 20 $\mu\text{L/s}$.
- Tiempo de isoterma: 1.5 min.

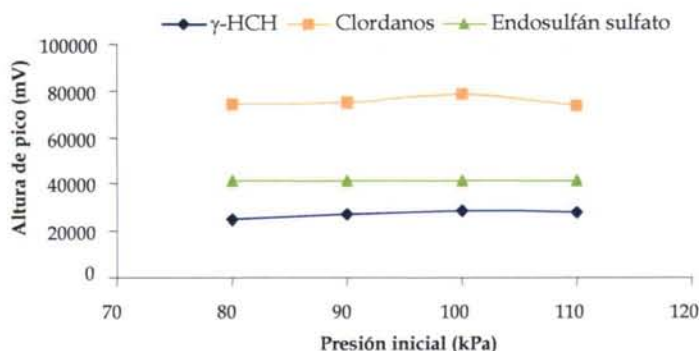


Figura III-27. Variación de la respuesta con la presión inicial (LVOCI-GC-ECD).

No se ha observado variación en la respuesta del γ -HCH ni del endosulfán sulfato al variar la presión inicial. En el caso de γ + α -clordano, se ha obtenido un ligero incremento de la respuesta a 100 kPa. Asimismo se ha observado un empeoramiento en la resolución de los picos a partir de 110 kPa, como se observa en el cromatograma de la figura III-28 obtenido a una presión de 130 kPa. Por todo ello se ha seleccionado 100 kPa como presión inicial del sistema.

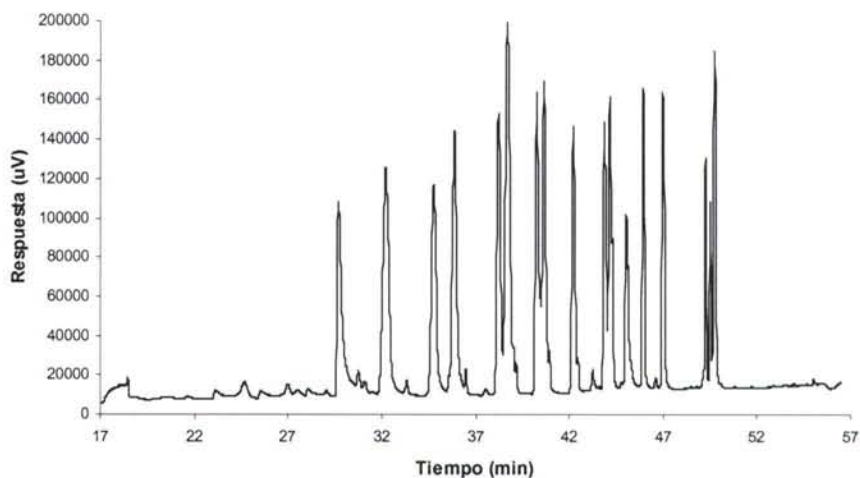


Figura III-28. Cromatograma obtenido cuando se aplica una presión inicial de 130 kPa (LVOCI-GC-ECD).

Tiempo de isoterma

Aunque el tiempo de isoterma inicial del horno no resultó significativo para ninguno de los analitos de interés, se ha considerado, ya que podría tener influencia en la resolución. Para el estudio del tiempo durante el cual permanece el horno a la temperatura inicial (75°C) se han ensayado valores comprendidos entre 0.47 y 2 min. El valor mínimo viene establecido por el propio equipo en función del valor del resto de los parámetros. Los valores para las demás variables son los ya optimizados.

- Temperatura inicial del horno: 75°C.
- Tiempo de cierre de SVE: 60 s.
- Velocidad de inyección: 20 $\mu\text{L/s}$.
- Presión inicial: 100 kPa.

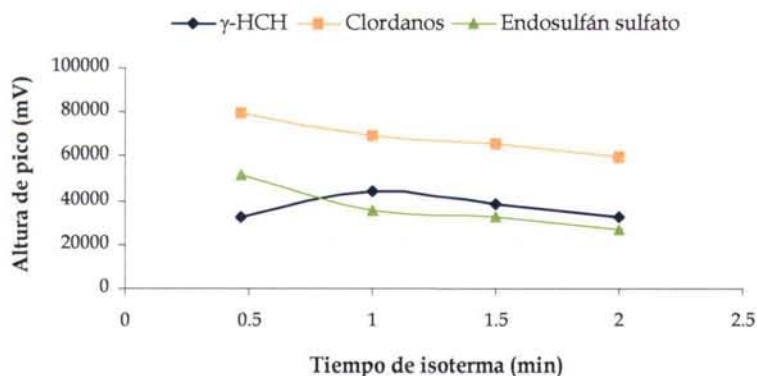


Figura III-29. Variación de la respuesta con la temperatura inicial del horno (LVOCI-GC-ECD).

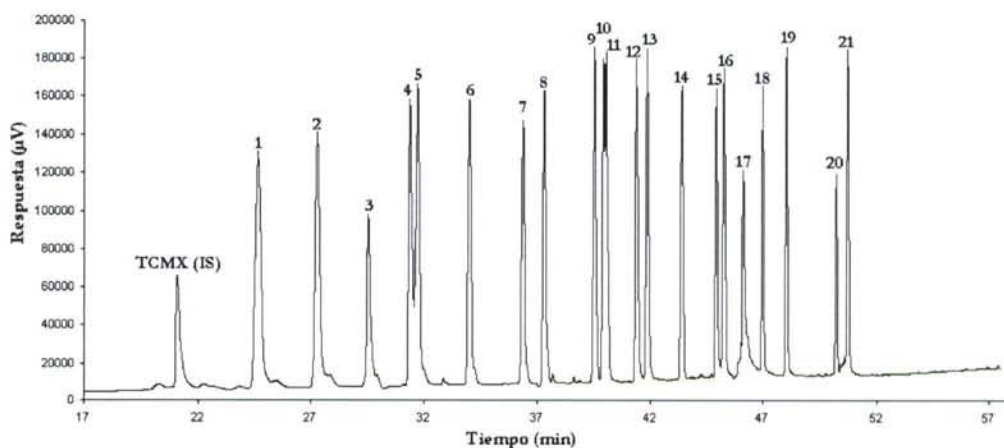
Como se puede ver en la figura III-29 no hay mucha variación de la respuesta con el tiempo de isoterma inicial del horno. La respuesta permanece casi constante en todo el intervalo estudiado para el endosulfán sulfato, y sólo se obtiene un ligero aumento de la misma para $\gamma+\alpha$ -clordano y para el γ -HCH al aumentar el tiempo de 0.47 a 1 min, permaneciendo constante a partir de ese valor. Por otra parte tampoco se han observado diferencias en cuanto a la separación de los compuestos. Por este motivo se escoge 1 min como tiempo de isoterma del horno. Las condiciones de inyección seleccionadas se presentan resumidas en la tabla III-34.

Tabla III-34. Condiciones seleccionadas para la inyección LVOC-GC-ECD.

Factores	Seleccionado
Disolvente	Acetato de etilo
Volumen de inyección	100 μ L
Temperatura inicial horno	75°C
Tiempo de cierre de SVE	60 s
Velocidad de inyección	20 μ L/s
Presión inicial	100 kPa
Tiempo de isoterma	1 min

El cromatograma que se muestra en la figura III-30 es el obtenido al inyectar un patrón de 0.005 μ g/mL en las condiciones finales seleccionadas. Como se puede

observar, la resolución de los analitos es buena, pudiéndose integrar todos de forma individual. Además el ruido de fondo es bajo, lo que permitirá obtener unos buenos límites de detección.



1 α -HCH	7 Isodrin	13 Dieldrin	19 Endosulfán sulfato
2 γ -HCH	8 Heptachlorepóxido	14 Endrin	20 Metoxicloro
3 β -HCH	9 γ -Clordano	15 p,p'-DDD	21 Endrin cetona
4 Heptacloro	10 α -Clordano	16 β -Endosulfán	
5 δ -HCH	11 α -Endosulfán	17 Endrin aldehído	
6 Aldrin	12 p,p'-DDE	18 p,p'-DDT	

Figura III-30. Cromatograma obtenido con el método optimizado de inyección *on-column* de grandes volúmenes (LVOCI).

7.5. Características analíticas del método

Se han determinado los límites de detección y cuantificación instrumentales del método de inyección LVOCI-GC-ECD propuesto. Éstos fueron calculados al igual que en los apartados anteriores como $\bar{x}_b + 3s_b$ y $\bar{x}_b + 10s_b$ respectivamente, siendo \bar{x}_b el valor medio del blanco y s_b su desviación estándar. Además se ha calculado el rango lineal, que abarca desde el límite de

cuantificación hasta el valor que se muestra en la tabla III-35 para cada compuesto.

Tabla III-35. Límites de detección (LD), cuantificación (LC) y rango lineal ($\mu\text{g/L}$) para la inyección *on-column* de grandes volúmenes (100 μL).

Pesticidas	LD	LC	Rango lineal
α -HCH	0.0082	0.0083	10
γ -HCH	0.0080	0.0081	10
β -HCH	0.1242	0.1244	15
Heptacloro	0.0005	0.0006	10
δ -HCH	0.0847	0.0847	15
Aldrín	0.0128	0.0128	10
Isodrín	0.0065	0.0066	10
Heptaclorepóxido	0.0022	0.0022	10
γ -Clordano	0.0017	0.0018	10
α -Clordano	0.0010	0.0010	10
α -Endosulfán	0.0073	0.0073	10
p,p'-DDE	0.0058	0.0058	10
Dieldrín	0.0052	0.0053	15
Endrín	0.0054	0.0054	15
p,p'-DDD	0.0137	0.0138	15
β -Endosulfán	0.0039	0.0040	15
Endrín aldehído	0.0186	0.0137	20
p,p'-DDT	0.0085	0.0085	10
Endosulfán sulfato	0.0034	0.0035	15
Metoxicloro	0.0113	0.0115	10
Endrín cetona	0.0016	0.0016	10

Los límites de detección obtenidos con la inyección *on-column* de grandes volúmenes son comparables a los encontrados en la bibliografía para la inyección de grandes volúmenes con temperatura programada con un volumen de inyección de 100 μL [Rankin, 1998].

Se ha evaluado asimismo la precisión instrumental, que ha resultado ser satisfactoria, midiendo tanto la repetibilidad mediante la inyección consecutiva de 11 alícuotas de patrón y la reproducibilidad mediante inyección de patrón durante 6 días alternos. Los datos se expresan como desviación estándar relativa (%) (tabla III-36).

Tabla III-36. Repetibilidad (A) (n=11) y reproducibilidad (B) (n=6) expresadas como desviación estándar relativa (%) para LVOCI.

Pesticidas	A	B	Pesticidas	A	B
α -HCH	5.1	7.7	p,p'-DDE	2.7	5.2
β -HCH	4.9	7.8	Dieldrín	3.0	7.2
γ -HCH	4.3	5.2	Endrín	4.3	6.6
δ -HCH	4.2	5.2	β -Endosulfán	5.1	6.5
Heptacloro	4.6	5.6	p,p'-DDD	5.1	6.0
Aldrín	5.3	4.1	Endrín aldehído	7.0	4.3
Isodrín	6.5	6.0	Endosulfán sulfato	3.6	7.0
Heptaclorepóxido	3.0	6.6	p,p'-DDT	3.0	6.2
γ -Clordano	2.9	4.2	Endrín cetona	4.0	7.0
α -Clordano	2.3	6.9	Metoxicloro	3.2	4.9
α -Endosulfán	3.4	4.1			

8. COMPARACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INYECCIÓN ESTUDIADOS

En este trabajo se han estudiado varias opciones de inyección cromatográfica: un sistema convencional de inyección *split/splitless*, sistemas de inyección *split/splitless* con temperatura programada (PSS), y un inyector *on-column* de grandes volúmenes (LVOCI). A continuación y a modo de resumen se muestra en la tabla III-37 una comparación del límite de detección y precisión (medida como repetibilidad) para cada compuesto analizado, con cada uno de estos inyectores para un mismo detector, el de captura de electrones. En todos los

casos se ha utilizado un inyector automático y se añadió TCMX como patrón interno.

Tabla III-37. Límites de detección en $\mu\text{g/L}$ y repetibilidad (% DER) para la inyección *split/splitless* (1 μL), la inyección PSS (20 μL) y LVOCI (100 μL).

Pesticidas	<i>split/splitless</i>	PSS	LVOCI
α -HCH	3.0 (0.65)	0.068 (2.5)	0.0082 (5.1)
γ -HCH	2.3 (0.76)	0.092 (1.6)	0.0080 (4.9)
β -HCH	0.4 (0.58)	0.124 (1.6)	0.1242 (4.3)
Heptacloro	0.7 (0.85)	0.066 (5.2)	0.0005 (4.2)
δ -HCH	4.1 (1.7)	0.068 (9.1)	0.0847 (4.6)
Aldrín	3.5 (0.84)	0.063 (5.1)	0.0128 (5.3)
Isodrín	0.7 (0.89)	0.111 (4.1)	0.0065 (6.5)
Heptacloropóxido	1.1 (1.3)	0.026 (2.4)	0.0022 (3.0)
γ -Clordano	1.8 (1.4)	0.076 (2.0)	0.0017 (2.9)
α -Clordano	1.3 (1.2)	0.093 (2.0)	0.0010 (2.3)
α -Endosulfán	1.8 (2.0)	0.057 (3.1)	0.0073 (3.4)
p,p'-DDE	2.0 (1.7)	0.109 (2.7)	0.0058 (2.7)
Dieldrín	3.6 (1.8)	0.071 (2.7)	0.0052 (3.0)
Endrín	3.7 (1.9)	0.092 (2.8)	0.0054 (4.3)
p,p'-DDD	4.9 (1.7)	0.079 (2.2)	0.0137 (5.1)
β -Endosulfán	3.0 (1.5)	0.076 (3.1)	0.0039 (5.1)
Endrín aldehído	0.2 (2.3)	0.052 (9.7)	0.0186 (7.0)
p,p'-DDT	8.0 (1.9)	0.135 (3.5)	0.0085 (3.6)
Endosulfán sulfato	1.0 (2.1)	0.086 (8.2)	0.0034 (3.0)
Metoxicloro	5.9 (1.4)	0.357 (4.9)	0.0113 (4.0)
Endrín cetona	3.5 (1.9)	0.101 (2.0)	0.0016 (3.2)

Como se puede comprobar a la vista de los resultados de la tabla III-37, el uso de inyectores de grandes volúmenes como el PSS o el LVOCI permite mejorar notablemente los límites de detección para un mismo detector, aunque esta mejora no es debida solamente al aumento del volumen de muestra inyectado. Así se han obtenido límites de detección más de 30 veces más bajos para la inyección PSS (se inyectan 20 μL) y de tres órdenes de magnitud para el LVOCI (se inyectan

100 μL) en comparación con la *split/splitless* (se inyecta 1 μL). Del mismo modo con la inyección *on-column* de grandes volúmenes se obtienen valores de límite de detección para la mayoría de los pesticidas 10 veces más bajos a los obtenidos con la inyección PSS cuando el volumen inyectado es cinco veces mayor.

La precisión instrumental es satisfactoria para los inyectores de grandes volúmenes, pero como es habitual cuando se inyectan volúmenes elevados, las desviaciones estándar relativas son algo mayores para los inyectores PSS y LVOC que las obtenidas con la inyección *split/splitless*.

Comparando la aplicabilidad de los tres tipos de inyección estudiados, los bajos límites de detección que presentan los inyectores de grandes volúmenes, permiten llevar a cabo el análisis de los pesticidas organoclorados niveles de traza y ultratrazas, y además reducir la cantidad de muestra a analizar (y por lo tanto a transportar, almacenar, etc...), lo que a su vez disminuye el tiempo de análisis y el consumo de reactivos, según sea el caso. De entre los dos inyectores de grandes volúmenes estudiados en este trabajo, el PSS es el que ofrece mayores posibilidades. Esto se debe a que en el inyector *on-column* de grandes volúmenes la vaporización de la muestra se produce directamente sobre la precolumna, por lo que ésta puede contaminarse tras un cierto número de inyecciones. Además tanto la precolumna como las conexiones con la válvula SVE son frágiles. En el caso del PSS la vaporización de la muestra se produce en una cámara de vaporización o *liner*, que puede ser fácilmente limpiada y/o cambiada. Estas características hacen del inyector PSS un sistema más robusto.

Además el incremento del volumen de muestra inyectado aumenta también la cantidad de sustancias interferentes introducidas en el sistema, por lo que sistemas en los que se inyectan 100 μL , como es el LVOC estudiado en este trabajo, son especialmente útiles cuando se analizan muestras relativamente limpias, como pueden ser las aguas. En el caso de matrices más "sucias" sería necesario realizar una purificación exhaustiva del extracto con el fin de que los compuestos presentes en la matriz no interfieran en el análisis ni dañen el sistema cromatográfico.

9. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE ENDRÍN y p,p'-DDT CON LOS DISTINTOS SISTEMAS DE INYECCIÓN

La degradación de compuestos térmicamente lábiles que se produce en el inyector como consecuencia de la presencia de sitios activos en el *liner* y las altas temperaturas debe ser controlada, como propone el método EPA 508, para así garantizar el correcto funcionamiento del sistema cromatográfico [EPA-508, 1995]. En el caso de los pesticidas organoclorados, los compuestos que se deben controlar son el endrín, que se descompone a endrín aldehído (EA) y endrín cetona (EC) y el p,p'-DDT que se transforma en p,p'-DDE y p,p'-DDD. El porcentaje de degradación se calcula según las siguientes fórmulas:

$$\text{Degradación de p,p'-DDT (\%)} = \frac{\text{ÁreaDDE} + \text{ÁreaDDD}}{\text{ÁreaDDT} + \text{ÁreaDDE} + \text{ÁreaDDD}} * 100$$

$$\text{Degradación de Endrín (\%)} = \frac{\text{ÁreaEA} + \text{ÁreaEC}}{\text{ÁreaEndrín} + \text{ÁreaEA} + \text{ÁreaEC}} * 100$$

Dichos porcentajes no deben exceder nunca el 20%, debiéndose aplicar medidas correctoras en caso de que ésto suceda (volver a silanizar el *liner*, cortar el extremo de la columna, etc...).

Dado que la degradación se produce como consecuencia de las altas temperaturas y de la presencia de sitios activos en el *liner* o en la precolumna, suele ser mayor cuando se emplean inyectores calientes *split/splitless* [Hoff y Zoonen, 1999]. Se espera por lo tanto que el uso de inyectores como el PSS o el LVOCI reduzca este porcentaje de degradación. Sin embargo, la presencia de lana de vidrio en el interior del *liner* que se emplea en los inyectores PSS en este trabajo, podría favorecer la aparición de sitios activos que provoquen la degradación de estos compuestos.

Se ha realizado un estudio comparativo de la degradación de endrín y p,p'-DDT para los sistemas de inyección estudiados (*split/splitless*, PSS y LVOCI), usando el mismo detector (ECD). Los patrones inyectados en cada caso fueron 0.1

$\mu\text{g/mL}$ en hexano para el inyector *split/splitless*, $0.01 \mu\text{g/mL}$ en hexano para el inyector PSS, y la misma concentración en acetato de etilo para el caso del LVOCI. El número de réplicas en todos los casos fue de 6. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III-38.

Tabla III-38. Degradación (%) de endrín y p,p'-DDT con los sistemas de inyección estudiados (GC-ECD).

	<i>split/splitless</i>	PSS	LVOCI
Degradación de endrín (%)	19	15	7.4
Degradación p,p'-DDT (%)	15	18	3.9

Como se puede observar, la menor degradación de los compuestos se produce en el inyector *on-column* de grandes volúmenes. La degradación que se ha obtenido en el inyector PSS puede ser debida a la presencia de lana de vidrio, como ya se comentó anteriormente, por lo que debe realizarse un control asiduo de este parámetro, y realizar el cambio o la resilanización de la misma cuando se obtengan valores superiores al 20%.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agüera A., Piedra L., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R., Contreras M. (2000). Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction. *The Analyst*, 125, 1397-1402.
- Aguilar C., Borrull F., Marcé R.M. (1997). Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 771, 221-231.
- Aguilar C., Ferrer I., Borrull F., Marcé R.M., Barceló D. (1999). Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 386, 237-248.
- Almeida-Azevedo D.d., Lacorte S., Vinhas T., Viana P., Barceló D. (2000). Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 879, 13-26.
- Anelli L., Munari F., Trisciani A., Castanho J.R. (2000). *Analysis of water contaminants at trace levels using large volume sampling techniques. Comparison of PTV, LVI, OCLVI and SPME*. 23RD International Symposium on capillary chromatography. Riva de Garda.
- Anelli L., Munari F., Trisciani A., Castanho J.R. (2001). Determination of water contaminants at trace levels using large-volume sampling techniques: Comparison of LVPTVI, LVOCI, and SPME. *American Laboratory*, May, 45-47.
- Baugh P.J. (1993). Gas chromatography. A practical approach. Irl. Press. Oxford.
- Beltran J., López F.J., Forcada M., Hernández F. (1997). Determination of triazine herbicides by capillary gas chromatography with large-volume on-column injection. *Chromatographia*, 44, 274-278.

- Chee K.K., Wong M.K., Lee H.K. (1996). Optimization of microwave-assisted solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments using a microwave extraction system with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 723, 259-271.
- Concha-Graña E., Turnes-Carou M.I., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D. (2002). Optimisation of a programmed split-splitless injector in the gas chromatographic-mass spectrometric determination of organochlorine pesticides. *Journal of Chromatography A*, 958, 17-24.
- Crescenzi C., Corcia A. di, Guerriero E., Samperi R. (1997). Development of a multiresidue method for analyzing pesticide traces in water based on solid-phase extraction and electrospray liquid chromatography mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 31, 479-488.
- Crockett-Butler J., Anderson R., Ragsdale J. (1999). *Full scan GC/MS analysis of drinking water using large volume on-column injection*. Application note. Thermo Finnigan, AN 9142.
- Engewald W., Teske J., Efer J. (1999). Programmed temperature vaporiser-based injection in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 856, 259-278.
- EPA-508 (1995). Method 508. Determination of chlorinated pesticides in water by gas chromatography with an electron capture detector.
- Feigl F., Oesper R.E. (1960). *Spot tests in organic analysis*. Elsevier Pub. Co., New York.
- Fillion J., Sauvé F., Selwyn J. (2000). Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 83, 698-713.
- Godula M., Hajslova J., Mastouska K., Krivánková J. (2001). Optimization and application of the PTV injector for the analysis of pesticide residues. *Journal of Separation Science*, 24, 355-366.

- Grob K. (1994). Injection techniques in capillary GC. *Analytical Chemistry*, 66, 109A-1019A.
- Hada M., Takino M., Yamagami T., Daishima S., Yamagushi K. (2000). Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas chromatography-mass spectrometry with programmable temperature vaporizer. *Journal of Chromatography*, 874, 81-90.
- Hankmeier T., Steketee P.C., Vreuls J.J., Brinkman U.A.T. (1999). At-line SPE-GC-MS of micropollutants in water using the PrepStation. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 364, 106-112.
- Hennion M.C. (1998). Automation in multiresidue analysis of pesticides using on-line solid-phase extraction and liquid chromatography. *Analisis*, 26, M131-M136.
- Ho W.H., Hsieh S.J. (2001). Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta*, 428, 111-120.
- Hoff G.R. van der, Zoonen P. van (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 843, 301-322.
- Jackson G.P., Andrews A.R.J. (1998). New fast screening method for organochlorine pesticides in water by using solid-phase microextraction with fast gas chromatography and a pulsed-discharge electron capture detector. *The Analyst*, 123, 1085-1090.
- Koning S. de, Kurano M., Janssen H.G., Brinkman U.A.T. (2004). AT-column, a novel concentration technique for large-volume injections in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1023, 165-174.
- Masqué N., Marcé R.M., Borrull F. (1998). Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 793, 257-263.
- Miliadis G.E. (1998). Analysis of pesticide residues in water samples by gas capillary chromatography. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 255-260.

- Miller J.C., Miller J.N. (1993). Estadística en química analítica. Addison-Wesley Iberoamericana S.A., Wilmington, USA.
- Miñones-Vázquez M., Vázquez-Blanco M.E., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Fernández-Fernández E., Prada-Rodríguez D. (2001). Application of programmed-temperature split/splitless injection to the trace analysis of aliphatic hydrocarbons by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 919, 363-371.
- Mol H.G.J., Althuisen M., Janssen H.G., Cramers C.A. (1996). Environmental applications of large volume injection in capillary GC using PTV injectors. *Journal of High Resolution Chromatography*, 119, 69-79.
- Mol H.G.J., Janssen H.G., Cramers C.A. (1995a). Large volume sample introduction using temperature programmable injectors: implications of liner diameter. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, 18, 19-2.
- Mol H.G.J., Janssen H.G.M., Cramers C.A., Vreuls J.J., Brinkman U.A.T. (1995b). Trace level analysis of micropollutants in aqueous samples using gas chromatography with on-line sample enrichment and large volume injection. *Journal of Chromatography A*, 703, 277-307.
- Montgomery D.C. (1991). Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley, México.
- Plackett R.L., Burman J.B. (1946). The design of optimum multifactorial experimental. *Biometrika*, 33, 305-325.
- Pocurull E., Agular C., Borrull F., Marcé R.M. (1998). On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography with mass spectrometric detection to determine pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 818, 85-93.
- Quayle W.C., Jepson I., Fowles I.A. (1997). Simultaneous quantitation of sixteen organochlorine pesticides in drinking waters using automated solid-phase extraction, high-volume injection, high-resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 773, 271-276.
- Rankin T. (1998). *Large volume injection of pesticides by ECD*. Technical Report. Environmental analysis, TR 9132.

- Russo M.V., Goretti G., Navigato T. (1998). Separation of polychlorinated biphenyls from chlorinated pesticides using aminopropyl bonded-phase cartridge and determination by GC-ECD. *Chromatographia*, 48, 293-298.
- Sabik H., Jeannot R. (1998). Determination of organonitrogen pesticides in large volumes of surface water by liquid-liquid and solid-phase extraction using gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 818, 197-207.
- Sherma J. (1999). Pesticide residue analysis: 1997-1998. *Journal of AOAC International*, 82, 561-574.
- Singh A.K., Spassova D., White T. (1998). Quantitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated hydrocarbons and polynitrohydrocarbons in spiked samples of soil, water and plasma by selected-ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 706, 231-244.
- Skoog Y., Leary J.J. (1994). *Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill, España.
- Statistical Graphics Corp. (1999). *Statgraphic Plus for Windows 4.0*.
- Stottmeister E., Hermenau H., Hendel P., Welsch T., Engewald W. (1991). Solid phase extraction/programmed temperature vaporizer (PTV) injection in GC-analysis of toxaphene and PCBs in aqueous samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 340, 31-34.
- Termonia A., Termonia M. (1997). Full scan GC-MS quantitation of pesticides in spring water at the 10 ppt level using large volume on-column injection. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 447-450.
- Teske J., Engewald W. (2002). Methods for, and applications of, large-volume injection in capillary gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 21, 584-593.
- Tipler A. (1993). *Gas chromatography instrumentation, operation, and experimental considerations*. En: *Gas Chromatography. A practical approach*. Oxford University Press Inc., New York.

- Vassilakis Y., Tsipi D., Scoullou M. (1998). Determination of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection, and high performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823, 49-58.
- Vidal J.L.M., Arrebola F.J., Mateu-Sánchez M. (2002). Multi-residue method for determination of pesticides in vegetable samples by GC-MS-MS. *Chromatographia*, 56, 475-481.
- Vogt W., Jacob K., Obwexer H.W. (1979). Sampling method in capillary column GLC allowing injections of up to 250 μ L. *Journal of Chromatography*, 174, 437-439.
- Weltzien H.C. (1958). Biological test for fungicidal substances on a paper chromatogram. *Naturwissenschaften*, 45, 288.
- Wylie P.L. (1997). *Trace level pesticide analysis by GC/MS using large-volume injection*. Application Note. Agilent Technologies.

CAPÍTULO IV: EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MATRICES ACUOSAS

CAPÍTULO IV: EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS EN MATRICES ACUOSAS

1. INTRODUCCIÓN	127
1.1. Técnicas de extracción de pesticidas en muestras acuosas	127
1.1.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....	128
1.1.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)	130
1.1.3. Otras técnicas de extracción en fase líquida.....	132
1.1.4. Extracción en fase sólida (SPE)	133
1.1.5. Microextracción en fase sólida (SPME).....	140
1.1.6. Extracción con barra agitadora (SBSE)	142
1.2. Pérdidas de los pesticidas por adsorción.....	143
2. MATERIAL, INSTRUMENTAL Y REACTIVOS.....	144
2.1. Material e instrumental	144
2.2. Reactivos	145
3. ESTUDIO DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	146
3.1. Tratamientos previos	147
3.2. Secado del disco	148
3.3. Elución	149
3.4. Secado del eluato.....	152
3.5. Concentración del extracto	153
4. ESTUDIO DE LOS FENÓMENOS DE ADSORCIÓN DE LOS PESTICIDAS	156
4.1. Adsorción al material	157
4.2. Adsorción a la materia orgánica presente en el agua.....	160
4.3. Adsorción en la etapa de filtrado.....	163

5. RESUMEN Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE SPE DESARROLLADO	165
6. REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DE MUESTRA MEDIANTE USO DE LA INYECCIÓN PSS-GC-ECD.....	169
7. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	171
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Técnicas de extracción de pesticidas en muestras acuosas

En la introducción de la presente memoria ya se ha comentado la importancia de la determinación de los pesticidas organoclorados en muestras acuosas, que incluyen tanto aguas destinadas al consumo humano, aguas de río, lixiviados, etc.

Debido a los bajos niveles en los que se presentan normalmente los pesticidas en el medioambiente, y a la legislación cada vez más restrictiva, es necesario el empleo de técnicas sensibles en su determinación, que habitualmente incluyen etapas de preconcentración de los analitos. El pretratamiento de las muestras en la determinación de pesticidas incluye el enriquecimiento del analito y la eliminación, completa o parcial, de los componentes de la matriz, para obtener un extracto cromatográfico lo más limpio posible y libre de partículas o sustancias que puedan interferir. Las técnicas más empleadas en la preconcentración de pesticidas en muestras líquidas pueden englobarse en dos grupos:

Técnicas en las cuales se produce la extracción a una fase líquida:

- Extracción líquido-líquido (LLE, *liquid-liquid extraction*).
- Extracción con fluidos supercríticos (SFE, *supercritical fluid extraction*).
- Otras técnicas de extracción a fase líquida.

O bien, aquellas en las que se produce el atrapamiento de los analitos sobre un adsorbente:

- Extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*).
- Microextracción en fase sólida (SPME, *solid phase microextraction*).
- Extracción con barra agitadora (SBSE, *stir bar sorptive extraction*).

A continuación se comentarán estas técnicas con más detalle.

1.1.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido es el método clásico para la extracción de pesticidas en muestras de agua [Balinova, 1996]. El principio de la extracción líquido-líquido es la distribución de la muestra entre dos disolventes inmiscibles en los cuales el analito y la matriz tienen distintas solubilidades (figura IV-1). Este proceso se basa en las relaciones descritas por la Ley de distribución de Nernst, que es más conocida como ley de partición. Según esta ecuación, la distribución del soluto entre dos fases inmiscibles dependerá de la afinidad/solubilidad del soluto en cada fase.

$$S_{\text{fase 1}} \leftrightarrow S_{\text{fase 2}}$$

Siendo la constante de equilibrio de esta relación:

$$K_D = \frac{[S_{\text{fase 2}}]}{[S_{\text{fase 1}}]}$$

donde K_D recibe el nombre de constante de distribución o coeficiente de reparto, $S_{\text{fase 2}}$ (normalmente la fase orgánica) y $S_{\text{fase 1}}$ (fase acuosa) representan las concentraciones existentes en el equilibrio en cada una de las fases. Si K_D es suficientemente grande, el soluto pasará de la fase 1 a la fase 2, produciéndose la extracción de la muestra [Fritz, 1999].

Con una selección apropiada del disolvente, ajustando el pH de la fase acuosa o su fuerza iónica se pueden alcanzar transferencias del 100% [Biziuk y Przyjazny, 1996]. El disolvente que se utiliza para llevar a cabo la extracción de compuestos organoclorados puede ser hexano [Ang y cols., 1989; Rico y cols., 1989; Cid-Montanes y cols., 1990; Vojinovic y cols., 1990; Lalah y cols., 2003], acetato de etilo [Suffet y Faust, 1972; Couillard, 1982], diclorometano [Marchand y cols., 1989; Leoni y cols., 1991; Provini y cols., 1991; Foster y cols., 1993; Getenga y cols., 2004] o bien distintas mezclas de disolventes [Agnihotri, 1994; Caldas y cols., 1999].

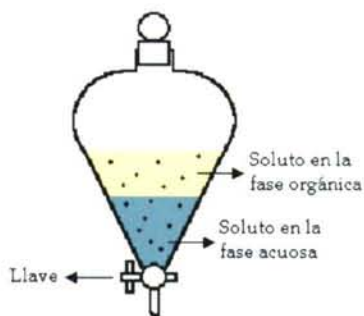


Figura IV-1. Embudo de decantación para extracción líquido-líquido.

Las ventajas de la LLE son el empleo de material de bajo coste, la gran disponibilidad de disolventes y su sencillez [Dean, 1998]. Presenta no obstante algunos inconvenientes, como es el empleo de gran volumen de disolventes de elevado coste (han de ser de elevada pureza), y en su mayoría tóxicos. Se crea además un problema de almacenaje de residuos peligrosos. El empleo de gran volumen de disolvente implica además el aumento del ruido de fondo que se obtiene una vez se preconcentra el extracto [Biziuk y cols., 1996].

La extracción líquido-líquido es la metodología propuesta por la USEPA (método 508) para la extracción de pesticidas organoclorados de muestras de aguas, aplicable tanto a aguas subterráneas como potables. En dicho método 1L de muestra es extraída por agitación en un embudo de separación con 2 fracciones de 60mL de cloruro de metileno [EPA-508, 1995].

Una variedad de la LLE es la microextracción líquido-líquido, que aparece descrita en el método EPA 505, en el cual se extraen 35 mL de agua con 2 mL de disolvente (hexano) [EPA-505, 1995]. En el caso de que se empleen técnicas de inyección de grandes volúmenes como las descritas en el capítulo anterior, el volumen de muestra procesado puede reducirse considerablemente. Con esta técnica se han determinado triazinas en concentraciones de entre 1-10 $\mu\text{g/L}$ extrayendo 1 mL de agua con 1 mL de hexano [Beltrán, 1997], pesticidas organoclorados y organofosforados empleando 3 mL de hexano [Anelli y cols., 2000], o en concentraciones que van desde 0.05-1 $\mu\text{g/L}$ extrayendo 7 mL de agua con 3

mL de disolvente [Anelli y cols., 2001]. Otros disolventes que se han empleado en el análisis de pesticidas con esta técnica son *tert*-butilmetiléter, que se aplicó al análisis de triazinas [Teske y cols., 1998], o el diclorometano, que se ha empleado en el análisis de compuestos semivolátiles (pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos principalmente) [Crockett-Butler y cols., 1999].

Otra variante es la microextracción con disolventes (SME, *solvent microextraction*). En esta técnica la muestra de agua es extraída con tan solo unos microlitros de disolvente. El disolvente se introduce en una jeringa que contiene un adaptador de modo que una vez introducida la jeringa en la muestra, una gota de 2 μ L de disolvente queda suspendida en el extremo de la jeringa, y permanece en contacto con la muestra agitada durante un tiempo de unos 5 min. Una vez transcurrido el tiempo de extracción la jeringa se retrae y se inyecta en el cromatógrafo. Este es un método económico, es rápido y consume poco disolvente [Jager y Andrews, 2000].

1.1.2. Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

Un fluido está en estado supercrítico cuando su presión y temperatura están por encima de su valor crítico. Los fluidos supercríticos poseen propiedades únicas, intermedias entre las propiedades de los gases y los líquidos, que permiten emplearlos como disolventes para llevar a cabo extracciones eficientes. En particular, su gran difusividad permite extracciones rápidas, y su densidad puede ajustarse de modo preciso [Camel, 1998]. Al disminuir la densidad del fluido también se produce una acumulación de moléculas de disolvente cerca de las partículas de soluto. Ésto es debido a que, cuando la densidad es baja, dominan las fuerzas de atracción entre las moléculas del soluto y las del disolvente, ya que estas fuerzas se manifiestan a distancias mayores que las fuerzas de repulsión [Fernández y Fernández-Prini, 1997].

El equipo de extracción con fluidos supercríticos (SFE, *supercritical fluid extraction*) (figura IV-2) consiste en una bomba de alta presión que impulsa el fluido, y una celda de extracción en la cual se somete a la muestra a presión y

temperatura. La mayoría de las veces se añade un disolvente orgánico, con el fin de mejorar la solvatación.

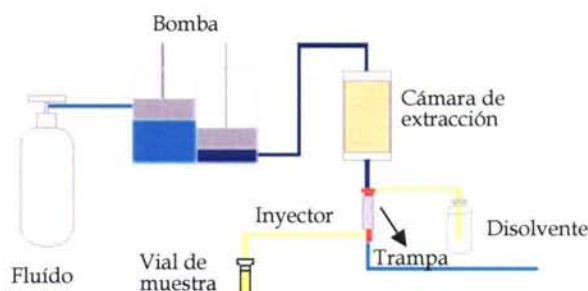


Figura IV-2. Esquema de un equipo de extracción con fluidos supercríticos.

El proceso de extracción tiene lugar en cuatro etapas. En la primera de ellas se produce la desorción de los compuestos de la matriz y su difusión en la misma. A continuación se produce la solubilización del analito por el fluido supercrítico, que seguidamente lo arrastra hacia el exterior de la celda. Por último se produce el atrapamiento de los solutos extraídos al despresurizar el fluido [Camel, 1998].

El CO_2 es el fluido más utilizado debido a su baja temperatura y presión crítica (31.1°C y 73.8 bares), baja reactividad, y a que es fácil de obtener con alta pureza, no es tóxico ni inflamable y es asequible. A pesar de que el CO_2 está clasificado como un disolvente no polar, como resultado de su gran momento dipolar presenta cierta afinidad hacia los compuestos orgánicos polares.

Esta técnica tiene gran aplicabilidad especialmente para muestras medioambientales complejas, y presenta grandes ventajas como son su rapidez, selectividad, fácil manejo y la facilidad de acoplamiento *on-line* y *off-line*. Además se elimina el empleo de disolventes, con lo cual los extractos obtenidos son más limpios, y se evitan las etapas de evaporación o concentración.

El principal inconveniente de la extracción directa con SFE de muestras de aguas es la relativa solubilidad del CO_2 supercrítico en el agua (0.3%), que provoca bajas eficacias de extracción [Barnabas y cols., 1994]. Debido a esto el

procedimiento más común para extraer muestras de agua es el acoplamiento de las técnicas de SPE y SFE, extrayendo en un primer paso los compuestos orgánicos de la fase acuosa con una fase sólida y eluyendo posteriormente los analitos mediante SFE. Esta técnica combinada se ha empleado para la extracción de varios contaminantes orgánicos (incluidos pesticidas organoclorados) de aguas, realizando la extracción con discos SPE de C₁₈ [Ho y cols., 1995; Camel, 1998].

1.1.3. Otras técnicas de extracción en fase líquida

Además de las técnicas antes comentadas, existen otras técnicas de extracción a una fase líquida que no son tan comunes en la extracción de pesticidas organoclorados, aunque pueden serlo para otros tipos de analitos. Algunas de estas técnicas se citan a continuación:

Extracción con membranas semipermeables

La extracción con membranas semipermeables consiste en emplear una membrana como barrera física entre dos fases para separar especies en función de sus características. Las membranas semipermeables estándar están diseñadas para extraer compuestos hidrofóbicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, *polycyclic aromatic hydrocarbons*), pesticidas organoclorados (OCP, *organochlorine pesticides*), policlorobifenilos (PCBs, *polychlorinated biphenils*), etc, de aguas [Verweij y cols., 2004]. La membrana consiste en una fina capa de un lípido neutro (trioleína), colocado dentro de un tubo de paredes finas de polietileno de baja densidad no poroso (no contienen poros en posiciones fijas, sino que las cavidades dependen de las condiciones térmicas). Estas cavidades tienen diámetros en torno a 10 Å. Este tamaño de poro implica que solo los compuestos químicos disueltos con masas moleculares menores de 600 uma son retenidos por estas membranas, de modo similar a lo que ocurre con las biomembranas, y así las sustancias extraídas son aquellas realmente biodisponibles [Petty y cols., 2000].

Métodos de purga y atrapamiento

Ésta es una de las técnicas de extracción en fase vapor, que se basan en el reparto de los analitos entre la muestra y una fase gaseosa (otra de ellas, el espacio

de cabeza, se comentará más tarde). En general esta técnica se aplica principalmente al análisis de compuestos orgánicos volátiles. En los sistemas de purga y atrapamiento (P&T, *purge and trap*), una corriente de gas inerte (nitrógeno, argon, helio...) se hace burbujear a través de la muestra, transfiriéndose los analitos a la fase gaseosa, y siendo arrastrados por el gas inerte hasta una trampa, que puede ser criogénica o una columna empaquetada con distintos adsorbentes. En el sistema de purga y atrapamiento (sistemas abiertos), el gas empleado se libera a la atmósfera una vez ha pasado por la trampa, lo que minimiza los riesgos de contaminación del sistema. Los adsorbentes más empleados son Tenax, y combinaciones de éste con carbón activo, gel de sílice o Chromosorb. Los sistemas de purga y atrapamiento pueden ser acoplados en continuo a la cromatografía de gases de un modo sencillo.

Uno de los principales inconvenientes que presenta esta técnica es el riesgo de contaminación debido a la gran cantidad de gas de purga que emplea, que debe ser de elevada pureza. Además, cuando la liberación de los analitos se produce por desorción térmica de los mismos, puede provocar la degradación térmica de los adsorbentes empleados, y producir en ocasiones compuestos interferentes que aumentan los límites de detección [Martín-Esteban y Fernández-Hernando, 2002].

1.1.4. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) implica poner en contacto una muestra líquida o gaseosa con una fase sólida o adsorbente donde el analito es adsorbido selectivamente en la superficie de la fase sólida [Dean, 1998]. La retención de la sustancia en el adsorbente sólido es predominantemente por fuerzas de Van der Waals.

La extracción en fase sólida es una técnica muy útil para el aislamiento de compuestos orgánicos del agua. Presenta diversas ventajas:

- Permite el aislamiento y preconcentración en el lecho del adsorbente tanto de los compuestos orgánicos volátiles, como de los no volátiles presentes en el agua.
- El agua y los compuestos inorgánicos apenas son retenidos y se eliminan del lecho en el lavado y secado que sigue al proceso de adsorción.
- Para adsorbentes seleccionados apropiadamente, los coeficientes de partición de los analitos entre el adsorbente y el agua se aproximan a infinito.
- Los adsorbentes no reaccionan químicamente con los analitos y en ocasiones éstos pueden ser regenerados, lo que alarga sus tiempos de vida.
- En contraste con la extracción líquido-líquido, los problemas asociados al uso de grandes volúmenes de disolventes son minimizados.
- Los analitos atrapados en el adsorbente pueden transportarse y almacenarse en él durante un tiempo, hasta que se realice la determinación final.
- El proceso de enriquecimiento es rápido y sencillo y se puede automatizar.

Entre las desventajas o limitaciones se encuentra el taponamiento del cartucho o la obstrucción de los poros que se produce en ocasiones cuando la muestra presenta material particulado, y que da lugar a pequeños volúmenes de ruptura. Además en ocasiones existe variación de los adsorbentes de lote a lote y se obtienen blancos elevados. Como esta técnica implica un procedimiento multisequencial, se limita a los analitos con volatilidades relativamente bajas, con puntos de ebullición mayores que el del disolvente.

El proceso que tiene lugar es el que se muestra en la figura IV-3. La muestra se hace pasar a través del adsorbente, quedando los analitos retenidos en él. A continuación, si se desea, se puede realizar un lavado del mismo, con el fin de eliminar sustancias interferentes, y finalmente se hace pasar a través del

adsorbente el disolvente de elución elegido, que arrastrará el analito de interés, dejando los componentes de la matriz adsorbidos.

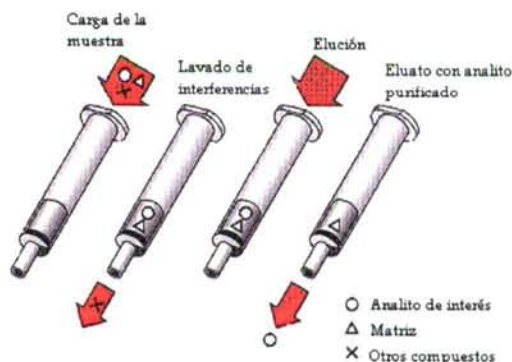


Figura IV-3. Esquema del funcionamiento de la extracción en fase sólida.

La elección del adsorbente y el disolvente a utilizar es muy importante para la efectiva preconcentración y limpieza del analito en la muestra, y depende de la naturaleza del compuesto y del sistema de extracción empleado.

El adsorbente más conocido es el carbón activo, que tiene una amplia aplicabilidad. Sin embargo en ocasiones tienen lugar adsorciones o desorciones incompletas, posibles reacciones del adsorbente con los analitos, y el ruido de fondo en ocasiones es elevado. La utilización de carbón grafitizado (GCB, *graphitized carbon black*) con mayor área superficial se estudió con éxito para la preconcentración de pesticidas organoclorados, triazinas y herbicidas fenoxiácidos de muestras de agua [Crescenzi y cols., 1997].

Las resinas macroporosas de amberlita XAD tienen extensa aplicación para aislar compuestos orgánicos del agua. Dentro de este tipo de resinas la que se emplea en la extracción de pesticidas organoclorados de muestras de aguas es la XAD-2 [Bidleman y cols., 1995; Iwata y cols., 1995] o combinaciones de XAD-2 y XAD-4 (ambos copolímeros de estireno-divinilbenceno) cuando se extraen simultáneamente pesticidas organoclorados y PAH [Luo y cols., 2004].

Otro adsorbente que proporciona buenas recuperaciones para la extracción de diversos contaminantes de muestras de aguas es el Florisil. Éste se ha empleado en columnas para la extracción de pesticidas organoclorados, PAH, PCBs, etc., de muestras de aguas y plasma, con recuperaciones comprendidas entre el 65-100% [Singh y cols., 1998].

Los adsorbentes más comúnmente empleados en el análisis de muestras de aguas son los geles de sílice químicamente modificados. Una ventaja que presentan estos adsorbentes es que son aplicables a gran variedad de analitos orgánicos. En el caso de la extracción de pesticidas los más adecuados son los de fase inversa que tienen grupos funcionales no polares como octadecilsilano (C_{18}), octilsilano (C_8) y metilsilano.

Recientemente se han introducido nuevos polímeros como el adsorbente Oasis HLB (poly (divinil-benceno-co-N-vinilpirrolidona)) con características a la vez hidrofílicas y lipofílicas y que se han aplicado con éxito al análisis de pesticidas [Almeida-Azevedo y cols., 2000]. Este adsorbente presenta unas excelentes propiedades humectantes que consiguen evitar la pérdida de eficacia de extracción que se produce con otros adsorbentes cuando éste se seca entre las distintas etapas, al formarse una interfase aire-agua. Esta propiedad la proporciona el monómero hidrofílico N-vinilpirrolidina. El poliestireno-divinilbenceno, lipofílico, proporciona las interacciones de Van der Waals y H-donor-H-aceptor que retienen los compuestos de interés [Öllers y cols., 2001].

La disposición de los adsorbentes puede ser en columna o en discos (figura IV-4). En las columnas la fase se coloca en un cartucho de polietileno o polipropileno, o bien en un tubo de vidrio que contiene de 100 a 500 mg de fase sólida con diámetro de partícula de 40 μm y tamaño de poro 300 Å [Viana y cols., 1996]. El adsorbente está colocado entre dos fritas que lo retienen y filtran el particulado. El flujo habitual es de 3-10 mL/min. En cambio en los discos las partículas tienen un diámetro de 5-10 μm y están enlazadas con finos hilos de PTFE (politetrafluoretileno) dando lugar a un disco de 0.5 mm de espesor y 25-90 mm de diámetro. Estos discos se colocan en un sistema típico de filtración y se

aplica vacío para forzar a la muestra a pasar, siendo el flujo habitual de 10-100 mL/min.

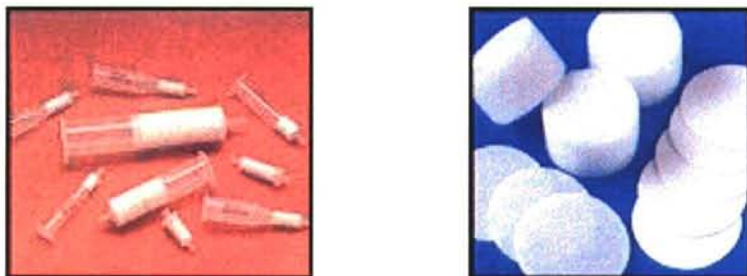


Figura IV-4. Cartuchos (izquierda) y discos (derecha) de extracción en fase sólida.

La principal ventaja que presentan los discos frente a los cartuchos es un menor tiempo de extracción debido a que su mayor área superficial y la delgada capa del adsorbente permiten flujos mayores de muestra. Sin embargo el empleo de flujos más elevados puede dar lugar a recuperaciones bajas del analito de interés, ya que hay un menor tiempo de interacción entre el analito y el adsorbente [Dean, 1998].

Tanto los discos como los cartuchos han sido ampliamente utilizados en la extracción de pesticidas organoclorados de muestras acuosas. Así se han empleado cartuchos C_{18} para la extracción de pesticidas organoclorados de aguas [Colina y cols., 1996; Patsias y Papadopoulou-Mourkidou, 1996; Vassilakis y cols., 1998]. También se ha empleado esta fase dispuesta en discos obteniendo recuperaciones analíticas para los pesticidas organoclorados de 80-120% [Chee y cols., 1996]. Los cartuchos C_8 también se han empleado exitosamente en la extracción de estos compuestos de aguas [Bidleman y cols., 1995].

Se han hecho estudios comparativos de la eficacia de ambos sistemas y comparando también distintas fases. Los discos y cartuchos con fase C_{18} se han empleado con éxito en la extracción de pesticidas de aguas subterráneas [Fernández-Alba y cols., 1998], comparando su eficacia con la de la extracción líquido-líquido, y se comprueba que los extractos obtenidos son más limpios en el caso de los cartuchos, siendo las recuperaciones similares en ambos casos. Asimismo comparando la eficacia de la extracción de 44 pesticidas de aguas

empleando discos y cartuchos de C_8 y C_{18} se comprobó que, teniendo en cuenta la eficacia para el total de los pesticidas estudiados, las mejores recuperaciones analíticas se obtenían con el cartucho de C_8 [Viana y cols., 1996]. Asimismo, también se han realizado estudios comparativos entre la eficacia de extracción de cartuchos C_{18} y cartuchos de los nuevos polímeros poliestireno-divinilbenceno (LiChrolut EN) y poli(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona) (Oasis HLB) [Jiménez y cols., 2001].

En ocasiones los discos pueden colocarse en serie, al igual que los cartuchos y así se han empleado discos de C_8 colocados en serie con discos de poliestirenodivinilbenceno (DVB) para extraer pesticidas de aguas superficiales y subterráneas [Albanis y cols., 1998].

La extracción en fase sólida también está contemplada por la USEPA como método de determinación de pesticidas organoclorados, herbicidas y organohalogenados en aguas subterráneas o potables (Método 508.1). En este método se emplean tanto discos como cartuchos, en ambos casos con grupos C_{18} [EPA-508.1, 1995].

Otra variedad de discos de extracción en fase sólida de aparición más reciente son los discos laminares, que consisten en un fino lecho de micropartículas soportados por una estructura laminar. Este tipo de disposición permite un mejor contacto entre el adsorbente y los analitos, y así se pueden aplicar mayores flujos de paso, incluso en el caso de muestras que contengan sólidos en suspensión, sin necesidad de realizar una filtración previa y sin que se produzca la obturación de los poros del adsorbente. Estos discos se han empleado en la extracción de pesticidas de aguas de consumo, con fase DVB para los pesticidas polares y moderadamente polares y C_{18} para los no polares [Pichon y cols., 1998; Fournier y cols., 1999].

Este último tipo de discos de extracción, discos laminares C_{18} , se estudian en este trabajo para llevar a cabo la extracción de pesticidas de muestras acuosas.

En la siguiente tabla (tabla IV-1), a modo de resumen, se pueden ver algunos ejemplos del empleo de la extracción en fase sólida para la determinación de pesticidas en muestras de aguas.

Tabla IV-1. Ejemplos de aplicación de SPE para la extracción de pesticidas organoclorados (OCP) en aguas.

Compuestos	Adsorbente	Dispositivo	Elución	R (%)	Referencias
Triazinas, OCP y organofosforados	Estireno divinilbenceno (SDB)	Cartucho	2.5+2.5 mL acetato de etilo	47-93	[Quintana y cols., 2001]
90 pesticidas	SDB	Cartucho	3 mL acetona+3 mL hexano+3 mL acetato de etilo	72-118*	[Tanabe y cols., 2000]
Organoclorados, organofosforados y organonitrogenados	Octadecilo (C ₁₈)	Cartucho	2+2 mL diclorometano (DCM)	90-101	[Wolska y cols., 1999b]
75 contaminantes orgánicos	OASIS (N-vinilpirrolidano/ divinilbenceno)	Cartucho	2.5 mL acetoneitrilo:DCM (1:1) + 3.2 mL DCM	74-147	[Almeida-Azevedo y cols., 2000]
Triacina, OCP y PAH	Octadecilo (C ₁₈)	Discos laminares	10 mL DCM+10 mL acetato de etilo:DCM (1:1)	76-128	[Fournier y cols., 1999]
Triazinas, OCP y organofosforados	Octadecilo (C ₁₈)+SDB	Discos	10+10 mL DCM:acetato de etilo (1:1)		[Albanis y cols., 1998]
Triazinas y OCP	Octadecilo (C ₁₈)	Cartucho	10 mL hexano	52-96	[Vassilakis y cols., 1998]
Triazinas, OCP y organofosforados	SDB	Precolumna	100 µL acetato de etilo (on-line SPE-GC-MS)	53-98	[Pocurull y cols., 1998]
α y β endosulfán Endosulfán sulfato	Octadecilo (C ₁₈)	Discos	20+20+20 mL acetato de etilo	40-89	[Peñuela y Barceló, 1998]

Recuperaciones analíticas (R%) para organoclorados excepto para (*) donde se da el valor para el total de pesticidas analizados.

1.1.5. *Microextracción en fase sólida (SPME)*

La microextracción en fase sólida (SPME, *solid phase microextraction*) fue desarrollada por Pawliszyn y sus colaboradores en 1990 [Arthur y Pawliszyn, 1990; Zhang y cols., 1994]. Consiste en dos procesos, un primer proceso de reparto de los analitos entre la muestra y el adsorbente, seguido de la desorción de los analitos concentrados. Se puede incorporar un proceso de lavado de interferencias usando disolventes selectivos, aunque normalmente esto no es necesario debido a la propia selectividad de los recubrimientos.

Para llevar a cabo la SPME se emplea una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria de cromatografía de gases. La fase estacionaria más comúnmente utilizada es el polidimetilsiloxano (PDMS) que es no polar [Magdic y Pawliszyn, 1996; Llompart y cols., 1998], aunque también se utiliza la fibra de poliacrilato para compuestos polares y no polares [Jinno y cols., 1996]. Se han realizado estudios comparativos de la eficacia de distintos tipos de fibras (carbowax-divinilbenzeno, carboxen-PDMS, y divinilbenceno-carboxen-PDMS) para la extracción de pesticidas organoclorados [Pérez-Trujillo y cols., 2002] obteniéndose buenos resultados con los 3 tipos de fibra. La fibra es químicamente inerte y muy estable incluso a alta temperatura. Su forma y tamaño permite incorporarla a un aparato similar a una jeringa (figura IV-5), que se acopla fácilmente al inyector cromatográfico, donde los analitos son térmicamente desorbidos [Zhang y cols., 1994]. Otra de sus ventajas es que el proceso se puede automatizar mediante el empleo de un muestreador automático modificado [Vreuls y cols., 1999].

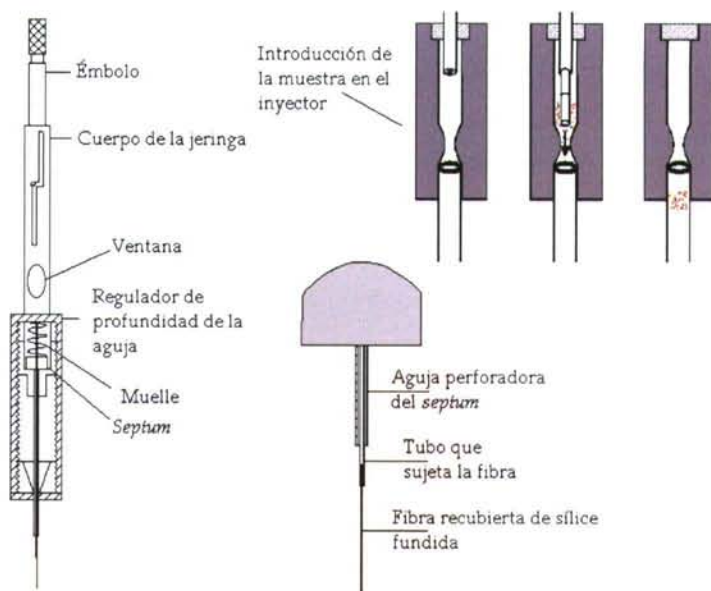


Figura IV-5. Sistema de SPME.

La geometría cilíndrica del sistema de microextracción en fase sólida permite una transferencia de masa rápida durante la adsorción y desorción, previene el taponamiento, elimina el uso de disolvente y facilita la introducción de los analitos en los instrumentos cromatográficos [Biziuk y Przyjazny, 1996]. Presenta también algunos inconvenientes. En algunos casos la extracción es incompleta, lo cual dificulta la cuantificación, y hace que la sensibilidad sea moderada. Cada analito se debe calibrar individualmente. Para solutos muy apolares el tiempo de extracción es largo incluso con agitación [Baltussen y cols., 1998].

La SPME ha sido ampliamente utilizada en la extracción de diversos tipos de pesticidas de aguas subterráneas y potables [Gonçalves y Alpendurada, 2002], y también para la extracción de pesticidas organoclorados [Jager y Andrews, 2000; Tomkins y Barnard, 2002].

Una variante de la SPME es la microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (HSSPME, *head space solid phase microextraction*) en la cual se hace un

muestreo de los analitos volátiles o semi-volátiles presentes, exponiendo la fibra al espacio de cabeza del vial. Se puede favorecer la migración de los analitos a la fase gas mediante calentamiento. Esta técnica también ha sido empleada en la extracción de pesticidas organoclorados de muestras de aguas [Doong y Liao, 2001]. Recientemente se ha realizado el acoplamiento de esta técnica con la extracción mediante energía de microondas (*microwave-assisted headspace solid-phase microextraction*, MA-HS-SPME) para llevar a cabo la extracción de pesticidas organoclorados de muestras de aguas. Para ello la muestra es introducida en un balón situado en el interior de un horno de microondas casero, al que se le ha acoplado mediante un tubo de vidrio unido al balón, una jeringa de SPME (queda situada en el exterior del horno) [Li y cols., 2003].

1.1.6. Extracción con barra agitadora (SBSE)

La técnica de extracción con barra agitadora (SBSE, *stir bar sorptive extraction*), fue introducida en 1999 por Baltussen y col. [Baltussen y cols., 1999], por lo que se trata de una técnica relativamente reciente. Se basa en los mismos mecanismos que la SPME, estando en este caso el adsorbente PDMS, recubriendo una barra agitadora magnética (figura IV-6). Esta barra se introduce en el seno de la muestra acuosa, y después de un determinado tiempo de agitación, y una vez que los analitos se han transferido al recubrimiento, la barra se desorbe térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, o bien se extrae con disolventes.

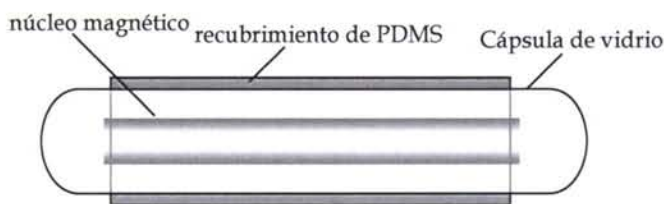


Figura IV-6. Barra agitadora de extracción.

La principal ventaja que presenta esta técnica frente a la SPME es el empleo de mayor cantidad de adsorbente (entre 25-100 μL frente 0.5 μL), que permite alcanzar menores límites de detección (inferiores al ng/L).

Esta técnica se ha aplicado a la extracción de PAH de muestras de aguas [Popp y cols., 2001], PAH y pesticidas organoclorados de muestras de aguas [León y cols., 2003], fungicidas en vino [Sandra y cols., 2001; Popp y cols., 2003], pesticidas organofosforados de muestras de aguas [Mothes y cols., 2003], etc.

1.2. Pérdidas de los pesticidas por adsorción

Debido al carácter hidrófobo y baja solubilidad en agua que presentan, los pesticidas organoclorados al igual que sucede con algunos PAH y PCBs [Wolska y cols., 1999a], tienen tendencia a adsorberse sobre diversos materiales dando lugar a bajas recuperaciones analíticas en los estudios de extracción. Se han observado problemas debido a la adsorción de los pesticidas sobre los recipientes, siendo mayor ésta para el Teflón que para el vidrio [Barceló y Hennion, 1997]. Para evitar esta adsorción se añade una proporción de disolvente orgánico a la muestra, generalmente un 1% de metanol. Algunos estudios muestran buenas recuperaciones para estos analitos sin añadir ningún disolvente orgánico, pero a menudo esos experimentos son realizados con niveles de concentración elevados, de incluso 50 $\mu\text{g/L}$, y por lo tanto la pérdida que se produce por adsorción es prácticamente despreciable. Sin embargo no lo es cuando se trabaja a niveles de concentración bajos, del orden de los exigidos por la legislación (inferiores a 0.1 $\mu\text{g/L}$ y de 0.03 $\mu\text{g/L}$ para algunos pesticidas en aguas de consumo) [Pichon, 1998].

Además de la adsorción a los recipientes, los pesticidas se adsorben fácilmente sobre la superficie del material particulado en suspensión, así como sobre los ácidos fúlvicos y húmicos, lípidos y proteínas que forman la materia orgánica disuelta. Teniendo esto en cuenta, el resultado que se obtenga al determinar la concentración de pesticidas en un agua dependerá del contenido de materia particulada en suspensión. Para eliminar estas partículas, la mayoría de los autores realizan el filtrado de las muestras, utilizando para ello filtros de fibra

de vidrio, Teflón, celulosa, etc... [Wolska y cols., 1999b]. De este modo se determinaría solamente la fracción de los pesticidas que se encuentra disuelta, despreciando los que están adsorbidos al particulado.

Realizando la adición de patrones a las aguas después de haber sido filtradas, las recuperaciones analíticas que se obtienen suelen ser buenas. Sin embargo se han observado pérdidas debido a la adsorción de los pesticidas disueltos sobre los filtros empleados para separar los sólidos en suspensión [House y Ou, 1992]. Todos estos aspectos hacen que en ocasiones las concentraciones de pesticidas que se obtienen sean inferiores a las reales.

Los problemas de la adsorción de los pesticidas han sido estudiados con detalle en el apartado 4 de este capítulo.

2. MATERIAL, INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

2.1. Material e instrumental

- Discos laminares de extracción en fase sólida Bakerbond Speedisk octadecilsilano (C_{18}) de J.T. Baker.
- Filtro de membrana de celulosa de tamaño de poro $0.45\ \mu\text{m}$ de Millipore; de nylon de tamaño de poro $0.2\ \mu\text{m}$ y filtro de PTFE (Teflón) con tamaño de poro $0.45\ \mu\text{m}$ de Lida y Filtro de fibra de vidrio (MNGF-6) con tamaño de poro $0.6\ \mu\text{m}$ de Macherey Nagel.
- Sistema distribuidor de vacío Visiprep con accesorio desecante Visidry de Supelco.
- Rotavapor Büchi modelo R-3000.
- Baño de ultrasonidos Branson, modelo 3200.
- Balanza Analítica AND modelo ER-180, de precisión $0.0001\ \text{g}$.
- Bomba de vacío Waters.
- Micropipetas Eppendorf con puntas desechables.

- Columnas de vidrio de 26 cm x 1 cm de Pobel.
- Tubos colectores de vidrio con tapón de rosca y septum de teflón.
- Lana de vidrio silanizada de Supelco.
- Material fungible de uso corriente en laboratorio.

2.2. Reactivos

- n-Hexano 95 % *SpS*, Romil.
- Acetato de Etilo (PAR), Panreac.
- Diclorometano, calidad para análisis de residuos, Romil.
- Metanol, calidad para análisis de residuos, Romil.
- Sulfato sódico anhidro, calidad para trazas de orgánicos, Merk.
- Agua Milli-Q (resistividad específica 18 M Ω /cm) mediante un sistema Milli-Q (Millipore Corp.).
- Detergente alcalino LA 13, Panreac.
- Patrón combinado de pesticidas Appendix IX Pesticide Mix, de Supelco, compuesta por aldrín, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, dieldrín, α -endosulfán, β -endosulfán, endosulfán sulfato, endrín, endrín aldehído heptacloro, heptaclorepóxido (isómero B), metoxicloro, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, en una concentración de 2 mg/mL, disueltos en una mezcla tolueno:hexano (50:50).
- Patrones individuales de α -clordano y γ -clordano 100 μ g/mL en hexano, y patrones sólidos de endrín cetona, decaclorobifenilo (DCBF) y 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno (TCMX) de Supelco, e isodrín Pestanal de Riedel-de-Haën.

Las disoluciones madre a partir de los patrones sólidos se realizaron en acetato de etilo con una concentración de 1000 μ g/mL, y los patrones de trabajo se prepararon por dilución de éstas en hexano.

3. ESTUDIO DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

Para llevar a cabo la extracción de los pesticidas organoclorados estudiados en este trabajo en muestras acuosas, se ha escogido como técnica la extracción en fase sólida que, como se comentó en la introducción de este capítulo, ha proporcionado buenos resultados. De los distintos dispositivos existentes para realizar la extracción en fase sólida se emplearán discos laminares Bakerbond Speedisk C₁₈ con partículas irregulares de 10 μm y tamaño de poro de 60 Å. El lecho resultante es de 50 mm de diámetro y 1 mm de espesor (figura IV-7). El fino lecho de micropartículas soportado por una estructura laminar permite un mejor acceso de los analitos al adsorbente.



Figura IV-7. Disco laminar de extracción en fase sólida.

La secuencia de operación para llevar a cabo una extracción en fase sólida implica varios pasos, cada uno de los cuales está caracterizado por la naturaleza del disolvente empleado. Cada uno de esos pasos ha sido estudiado con el fin de escoger aquellos parámetros más apropiados en nuestro caso.

3.1. Tratamientos previos

Lavado del adsorbente

En primer lugar se lava el adsorbente con los disolventes que posteriormente se emplearán en la elución de los analitos. Con esta etapa se eliminan las impurezas que se pudieran introducir durante la fabricación o almacenamiento del disco. En este caso se ha realizado el lavado del disco a gravedad con 5 mL de hexano, seguido por 5 mL de acetato de etilo.

Acondicionamiento

Se humedece la superficie del disco con 10 mL de metanol. El metanol activa las cadenas hidrofóbicas de los adsorbentes en fase inversa, aumentando el área superficial efectiva y permitiendo así un mejor contacto entre el analito y el adsorbente.

El acondicionamiento se lleva a cabo con un disolvente similar a la muestra que va a ser extraída. En el caso de la extracción de muestras de agua se acondiciona el adsorbente con agua destilada. Cuando aún queda una fina película de metanol cubriendo el disco, se acondiciona el disco con 10 mL de agua Milli-Q. Es muy importante que en esta etapa la superficie del disco no se llegue a secar, ya que podría formarse una interfase agua-aire en los poros del adsorbente que impediría el contacto satisfactorio entre el adsorbente y los analitos, dando lugar a bajas recuperaciones analíticas [Ho y cols., 1995]. Por el mismo motivo no debe secarse el disco entre esta etapa y la siguiente.

Introducción de la muestra

El paso de la muestra a través del disco se consigue en este caso mediante una bomba de aspiración. El flujo aplicado influye en la retención de los analitos por parte del disco, ya que flujos demasiado elevados no permiten una correcta interacción entre el adsorbente y el analito. Empleando discos clásicos (no laminares) el flujo habitualmente utilizado para obtener eficacias de extracción satisfactorias es del orden de 50 mL/min. En el caso de los discos laminares que se han escogido en este trabajo el flujo de aspiración para obtener una eficacia de

extracción similar ha sido de aproximadamente 150 mL/min, lo que acorta considerablemente el tiempo necesario para el paso de la muestra.

El volumen de muestra procesado fue 500 mL, ya que se comprobó que con esta cantidad de muestra se pueden determinar sin dificultad los analitos a niveles inferiores a los establecidos por la legislación de aguas más restrictiva (0.03 µg/L para algunos pesticidas en aguas destinadas al consumo público). A este volumen se le añade inicialmente un 1% de metanol, ya que, como se dijo anteriormente, éste es el porcentaje empleado en la bibliografía consultada.

Lavado de compuestos interferentes

Se efectúa para eliminar posibles sustancias interferentes, de polaridad distinta a los analitos de interés. Si los analitos de interés son pesticidas organoclorados (poco polares) el lavado, en caso de que fuera necesario, se realizaría con un disolvente de elevada polaridad.

En este estudio no se ha realizado un lavado de sustancias interferentes ya que no se ha detectado su presencia.

3.2. Secado del disco

Posteriormente al paso de la muestra, el disco debe ser secado para eliminar la mayor parte de agua posible. Para ello se hace pasar aire a través del disco conectando la bomba de aspiración con la máxima potencia durante un tiempo. Con este secado se favorece el posterior contacto entre el eluyente orgánico, inmiscible con el agua, y los analitos retenidos en el adsorbente.

Se han realizado ensayos con tiempos de secado de 5, 10, 15 y 30 min.

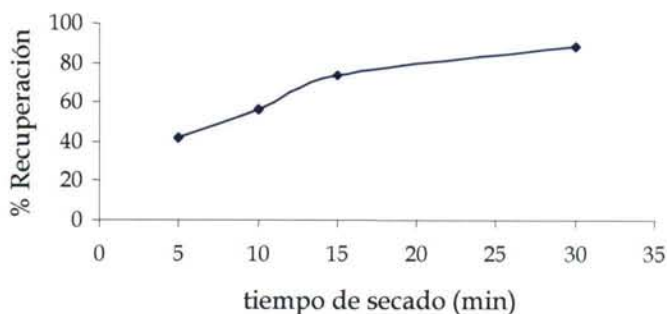


Figura IV-8. Recuperación analítica media obtenida con distintos tiempos de secado del disco de SPE.

Como se puede ver en la gráfica de la figura IV-8 en la que se representa el valor medio de los porcentajes de recuperación analítica para todos los compuestos, se obtienen mejores recuperaciones cuanto mayor es el tiempo de secado. Sin embargo al aumentar éste también aumenta el fondo que se obtiene en el cromatograma. Por este motivo y para no alargar demasiado el proceso de extracción no se ensayaron tiempos mayores y se escoge 30 min como tiempo de secado.

3.3. Elución

La elución se lleva a cabo con un disolvente menos polar que la muestra. La eficacia de un disolvente en la etapa de elución depende principalmente de la afinidad del analito por ese disolvente, de la cantidad de analito retenido sobre el adsorbente y del número de etapas de elución. Este proceso ha de efectuarse lentamente para favorecer la desorción, y por ello en este trabajo se realizó la elución a gravedad.

En la extracción de pesticidas organoclorados con una fase C_{18} los disolventes de elución habitualmente empleados son el acetato de etilo [Patsias y Papadopoulou-Mourkidou, 1996; Jiménez y cols., 2001; Zhang y cols., 2004], el hexano [Vassilakis y cols., 1998], diclorometano [Albanis y cols., 1998; Sun y cols., 2002], acetona [Jiménez y cols., 2001] o mezclas de los mismos. El volumen de disolvente varía en cada caso estando comprendido normalmente entre 5 y 30 mL. Dentro de

las combinaciones de disolventes la más común es la elución con 5 mL de acetato de etilo seguida de otros 5 mL de hexano [Chee y cols., 1996; Viana y cols., 1996].

Se han efectuado varios ensayos con distintas combinaciones de disolventes y volúmenes de los mismos con el fin de determinar la combinación más adecuada en este caso. Los ensayos realizados por duplicado son los siguientes:

A: 10 mL de acetato de etilo (AE) + 10 mL de hexano (H) recogidos y analizados por separado.

B: 10 mL de diclorometano (DCM) + 10 mL de hexano (H) recogidos y analizados por separado.

C: 10 mL de mezcla diclorometano/hexano (30/70).

D: 10 mL de acetato de etilo + 3 mL de hexano recogidos juntos.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura siguiente (figura IV-9).

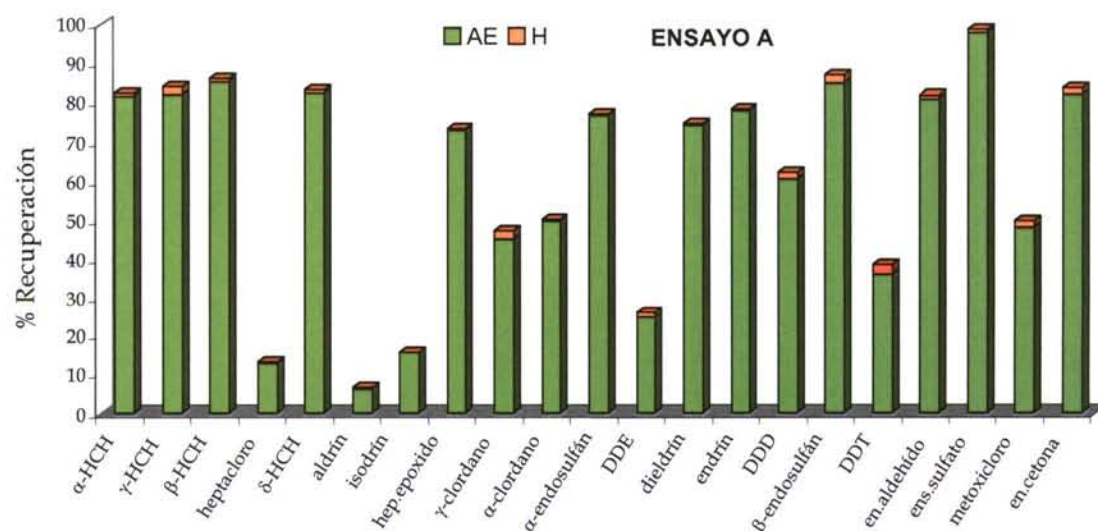


Figura IV-9. Recuperaciones (%) obtenidas con los distintos disolventes de elución del disco de SPE (continúa).

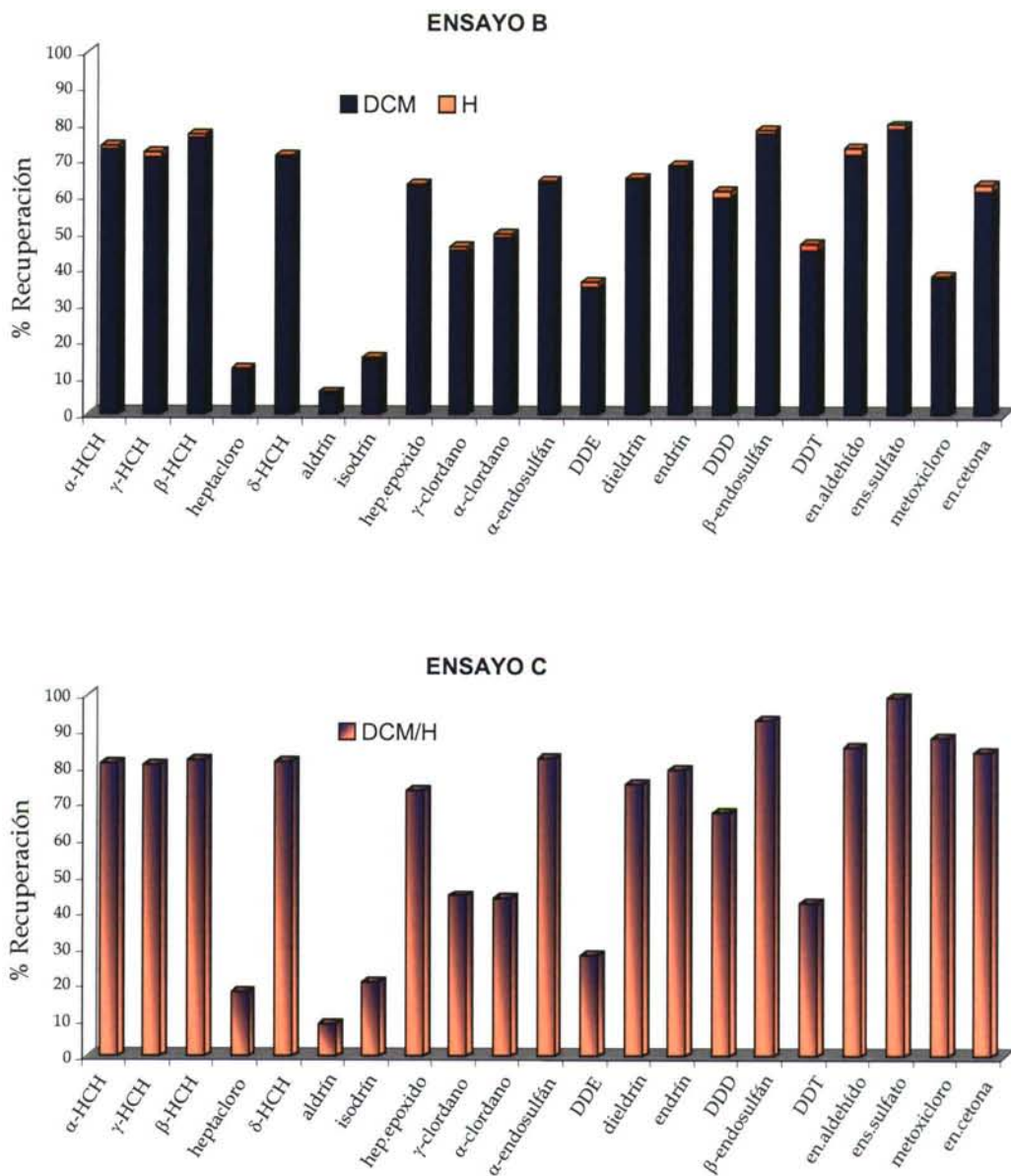


Figura IV-9. Recuperaciones (%) obtenidas con los distintos disolventes de elución del disco de SPE (continúa).

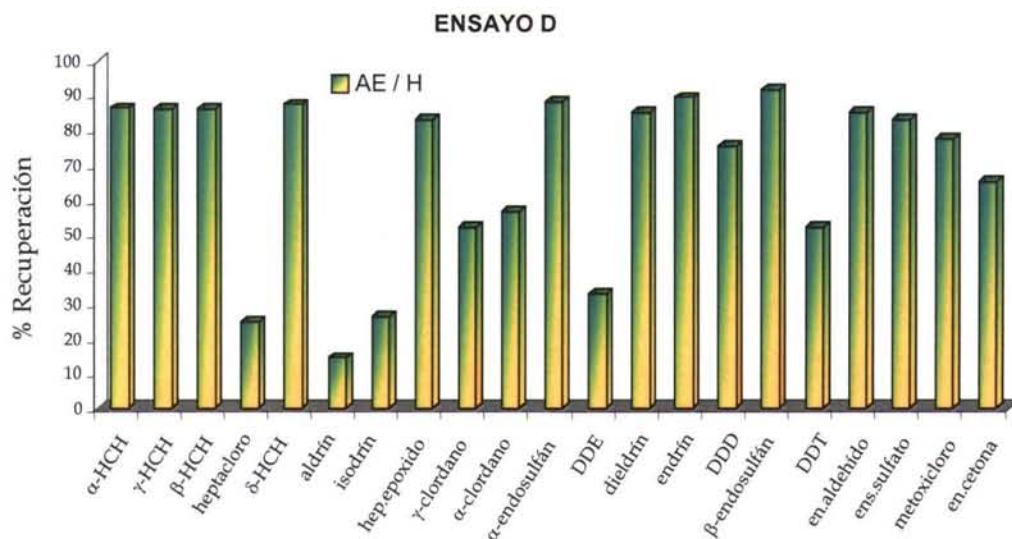


Figura IV-9. Recuperaciones (%) obtenidas con los distintos disolventes de elución del disco de SPE.

Como se puede observar en la figura IV-9, los mejores resultados globales se obtienen con la mezcla del ensayo D (10 mL de acetato de etilo + 3 mL de n-hexano recogidos juntos). De los resultados obtenidos en los ensayos en los cuales se recogieron fracciones separadas se puede concluir que la mayor proporción de los compuestos son recogidos en la fracción de acetato de etilo, mientras que apenas se recuperan analitos en la fracción de hexano. Se han obtenido bajas recuperaciones con todas las mezclas para algunos compuestos (heptacloro, aldrin isodrin,...). Estos valores se explicarán en los siguientes apartados.

3.4. Secado del eluato

Debido a la incompatibilidad del agua con la técnica de detección utilizada, es imprescindible que el eluato esté completamente seco antes de ser introducido en el sistema cromatográfico. El secado del disco con aire que se realiza tras el paso de muestra elimina la mayor parte del agua retenida en el disco, pero aún así quedan trazas de agua que son arrastradas por el disolvente de elución y podrían dañar el detector.

Para eliminar el agua restante se pasa el eluato recogido a través de una columna de vidrio rellena con sulfato sódico anhidro (previamente lavado en ultrasonidos con acetato de etilo y hexano, y secado en estufa a 100°C durante 12 h).

3.5. Concentración del extracto

Debido a la sensibilidad requerida en el análisis de trazas, el extracto ha de ser concentrado antes de su determinación final. Esta etapa puede ser una causa importante de pérdidas de ciertos analitos, especialmente los más volátiles, por lo que ha de ser estudiada con detenimiento.

Existen diversas técnicas de concentración de los extractos orgánicos.

El rotavapor (figura IV-10) es muy útil para la reducción de volúmenes elevados de disolvente y proporciona buenos resultados cuando los analitos no son excesivamente volátiles y son térmicamente estables a la temperatura y presión fijadas [Aguilar y cols., 1997; Thompson y Miller, 1998].



Figura IV-10. Rotavapor.

Otro de los métodos más empleados en la concentración de extractos es la evaporación bajo una corriente de gas inerte. Este procedimiento es lento y moderado por lo que es útil para volúmenes de disolventes no muy elevados y produce menos pérdidas que el rotavapor para analitos volátiles. El gas más empleado en estos casos es el nitrógeno [Colina y cols., 1996]. En ocasiones se

combinan ambas técnicas evaporando la mayor parte del disolvente hasta un pequeño volumen en rotavapor, y a continuación llevándolo a sequedad en corriente de nitrógeno [Pichon y cols., 1998].

En este trabajo se ensayaron la evaporación en rotavapor y con corriente de nitrógeno, así como la combinación de las mismas. Asimismo se ensayó la evaporación empleando un sistema de distribución de vacío comercial, Visiprep provisto de un accesorio desecante Visidry, que combina el vacío con una corriente de gas inerte (figura IV-11).



Figura IV-11. Sistema Visiprep con accesorio desecante Visidry.

Para realizar la puesta a punto de esta etapa, se llevó a cabo la evaporación, con los distintos métodos antes citados, de una mezcla de 5mL de acetato de etilo y 5 mL de hexano a la que se añade 1 mL de mezcla de patrón de pesticidas de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se han empleado estos volúmenes de disolvente debido a que estos ensayos se realizaron antes del estudio de la etapa de elución, y ésta era la mezcla más empleada en la bibliografía. Posteriormente, una vez escogida la mezcla de elución se evaluó nuevamente la recuperación analítica con el método de concentración seleccionado.

La evaporación empleando solamente corriente de nitrógeno se descartó después de realizar unas pruebas iniciales, dado que para evaporar el volumen

deseado se necesita un tiempo excesivo (más de tres horas aplicando un flujo de nitrógeno de 100 mL/min).

Se realizaron tres réplicas de cada uno de los ensayos que se citan a continuación:

- Rotavapor: Evaporación a sequedad en rotavapor.
- Visiprep: Evaporación a sequedad en Visiprep con un flujo de nitrógeno de 25 mL/min, combinado con el vacío que se obtiene con una bomba de aspiración (-33.5 kPa).
- Combinado 1: Evaporación en rotavapor hasta un volumen de unos 2 mL y llevando a sequedad en corriente de nitrógeno (flujo 35 mL/min).
- Combinado 2: Evaporación en rotavapor hasta una gota (volumen aproximado 0.2 mL) y a sequedad en corriente de nitrógeno (flujo 35 mL/min).

Todos los extractos llevados a sequedad se redisolviéron en 1 mL de hexano, disolvente compatible con la posterior determinación cromatográfica. Como se puede ver en la figura IV-12, el sistema de evaporación empleando Visiprep con su accesorio desecante Visidry y el método combinado 1 dan lugar a bajas recuperaciones analíticas de los compuestos más volátiles. Además ambos métodos son lentos (el Visiprep tarda más de una hora en evaporar la totalidad del disolvente, y el método combinado 1 casi 45 minutos). Tanto el rotavapor como el método combinado 2 dan buenos resultados. De ambos métodos se elige el método combinado 2 ya que se producen pérdidas algo menores de los compuestos más volátiles. Además el método combinado 2 presenta mayor precisión que los demás métodos.

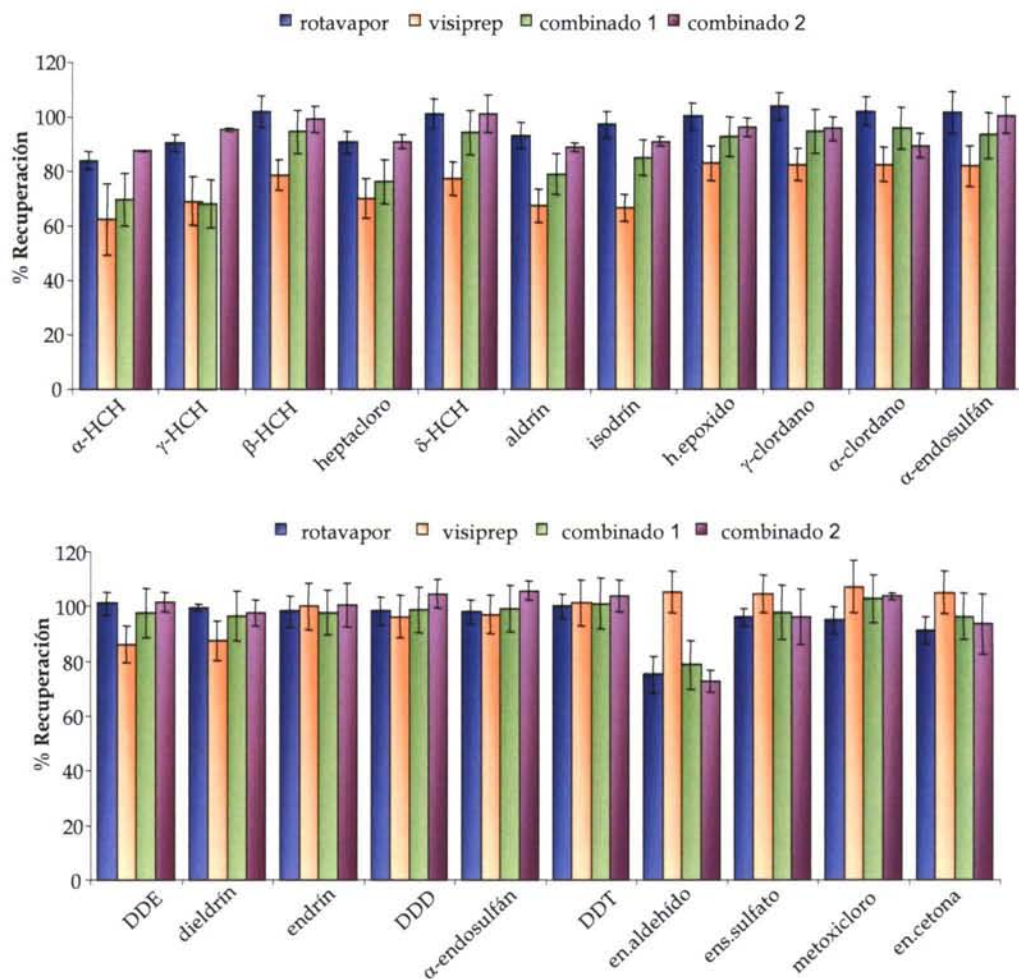


Figura IV-12. Recuperación analítica (%) obtenida con los distintos sistemas de evaporación (n=3).

4. ESTUDIO DE LOS FENÓMENOS DE ADSORCIÓN DE LOS PESTICIDAS

Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, los pesticidas organoclorados, debido a su carácter hidrofóbico y baja solubilidad en agua, tienden a adsorberse sobre distintos materiales, hacia los que presentan una mayor afinidad. Para evaluar las pérdidas originadas por este fenómeno se ha

estudiado la adsorción sobre los materiales con los que entra en contacto la muestra, la adsorción a la materia orgánica presente en el agua, y la adsorción sobre los filtros.

4.1. Adsorción al material

Al hacer el estudio del procedimiento de extracción con agua Milli-Q se añadió inicialmente un 1% de metanol para intentar evitar la adsorción de los pesticidas a los recipientes, ya que este es el porcentaje que se emplea habitualmente en la bibliografía consultada. Sin embargo, en los ensayos realizados se han observado bajas recuperaciones analíticas para isodrin, α -clordano, γ -clordano, aldrín, heptacloro, p,p'-DDE y p,p'-DDT. Este problema ya ha sido documentado para los 4 últimos compuestos en un sistema de extracción en fase sólida de pesticidas en aguas *on-line* [Louter y cols., 1996]. Estas pérdidas se atribuyen a la posible adsorción de los compuestos sobre las válvulas o tubos del sistema. Añadiendo a la muestra de agua 30% de metanol como modificador orgánico se mejoraron considerablemente las recuperaciones para estos compuestos.

Teniendo en cuenta los resultados de ese trabajo, se realizaron ensayos aumentando la proporción de metanol añadida a la muestra antes de su extracción. Se añaden a 500 mL de agua Milli-Q un 1, 10, 20, 30 y 40 % (v/v) de metanol antes de efectuar la adición con 1 mL de patrón de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ y se agita en ultrasonidos durante 5 min. Los resultados que se obtienen de estas extracciones son los que se presentan en la figura IV-13.

■ 1% MeOH ■ 10% MeOH ■ 20% MeOH ■ 30% MeOH ■ 40% MeOH

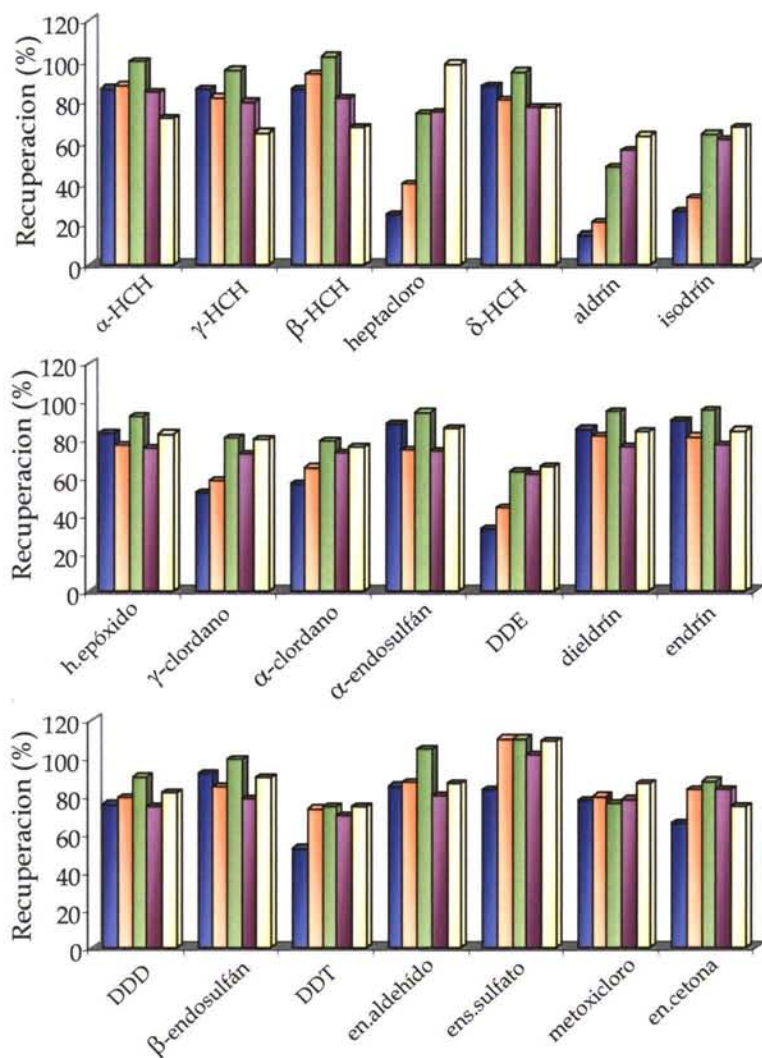


Figura IV-13. Recuperación analítica (%) obtenida con los distintos porcentajes de metanol (n=2) en la extracción SPE.

Como se puede observar en las figuras, al aumentar el porcentaje de metanol las recuperaciones analíticas que se obtienen para los compuestos antes

citados aumentan. Así para un 20% de metanol se obtiene aproximadamente un 80% de recuperación para los clordanos, en torno a un 75% para heptacloro y p,p'-DDT, por encima del 60% para isodrin y p,p'-DDE y aproximadamente un 50% para aldrin.

Por encima de un 20% de metanol, las recuperaciones de estos compuestos aumentan poco y se observa una disminución en el porcentaje de recuperación analítica que se obtiene para algunos de los demás pesticidas estudiados, como es el caso de los isómeros de HCH. Además estos porcentajes tan elevados suponen un gran consumo de disolvente. Por todo ello se escoge un 20% como la cantidad de metanol más apropiada para minimizar la adsorción a los recipientes.

Las mayores pérdidas que se producen para isodrin, α -clordano, γ -clordano, aldrin, heptacloro, p,p'-DDE y p,p'-DDT pueden explicarse por el hecho de que este grupo de compuestos son los más apolares y menos solubles en agua, lo que puede provocar que cuando se encuentran en este medio tengan una gran tendencia a adsorberse ya sea a los recipientes, o como veremos más adelante, sobre la materia orgánica en suspensión o los filtros.

Debido a las grandes pérdidas que se pueden producir para algunos pesticidas por la adsorción de los mismos sobre el vidrio y el Teflón, es necesario tener en cuenta este hecho a la hora de realizar la toma de muestra de las aguas. Si la adsorción a las paredes tiene lugar de modo reversible sería suficiente con añadir el metanol en el momento de llegar al laboratorio, mientras que si es irreversible es necesario añadirlo al tomar la muestra. Para estudiar este comportamiento se hicieron dos ensayos con agua Milli-Q añadiendo un 20% de metanol 10 min después de realizar la adición del patrón sobre la muestra (ensayo A) y añadiéndolo antes de realizar la adición (ensayo B). Los resultados de los 2 ensayos se muestran en la figura IV-14, representando en ella aquellos pesticidas en los que se produce una mayor variación de la recuperación.

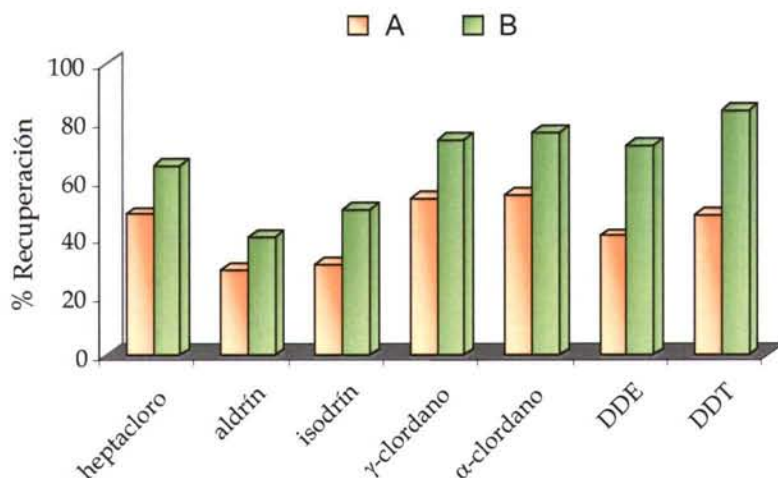


Figura IV-14. Adsorción de los pesticidas a las paredes de los recipientes al añadir un 20% de MeOH después de sobrecargar con patrón (A) o antes de la sobrecarga (B).

A la vista de la figura IV-14 se puede concluir que para reducir la adsorción de los pesticidas antes citados es necesario adicionar metanol al recipiente antes de la toma de muestra. Para los demás pesticidas estudiados las recuperaciones analíticas obtenidas son similares en los dos ensayos, lo que indica que no se ven tan afectados por la adsorción.

4.2. Adsorción a la materia orgánica presente en el agua

Con el fin de estudiar la adsorción a la materia orgánica del agua, se añadió un patrón de los pesticidas estudiados sobre muestras de aguas con distinto contenido de materia orgánica (agua Milli-Q, agua de abastecimiento, manantial, agua de pozo y agua de río). Para todas las muestras se determinó el valor del pH, conductividad y cantidad de materia orgánica (tabla IV-2).

Para llevar a cabo las medidas de conductividad y pH se siguieron los "Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales" [Franson, 1992]. Para la determinación de la materia orgánica se empleó el método del consumo de permanganato potásico [Merk, 1988].

Tabla IV-2. Parámetros físico-químicos de las muestras de agua estudiadas.

Muestra	pH	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Materia orgánica ($\text{mg KMnO}_4/\text{L}$)
Milli-Q	5.30	1.64	-
Abastecimiento	7.09	165	2.53
Manantial	6.08	270	3.47
Pozo	6.07	244	3.16
Río	6.84	52	9.16

A todas las muestras analizadas se les añadió un 20% de metanol para evitar la adsorción al material. Sin embargo, como se puede ver en la figura IV-15, se observa que el porcentaje de recuperación analítica que se obtiene para algunos compuestos disminuye drásticamente al aumentar la cantidad de materia orgánica de la muestra, siendo este efecto más claro en el caso de aldrín e isodrin.

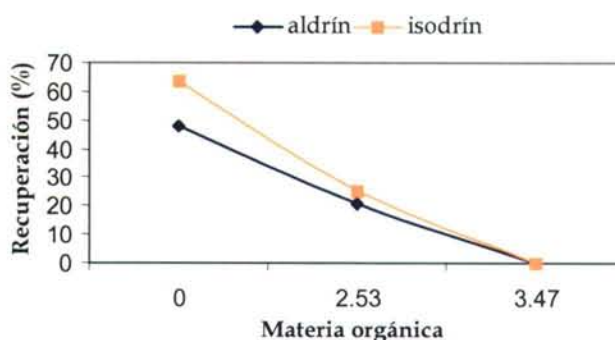


Figura IV-15. Variación de la recuperación analítica (%) con la cantidad de materia orgánica de la muestra ($\text{mg KMnO}_4/\text{L}$).

Así, cuando se extrae agua de grifo, es necesario añadirle un 30% de metanol para obtener recuperaciones analíticas de los compuestos antes citados similares a las que se obtenían con agua Milli-Q, como se comprueba en la figura IV-16.

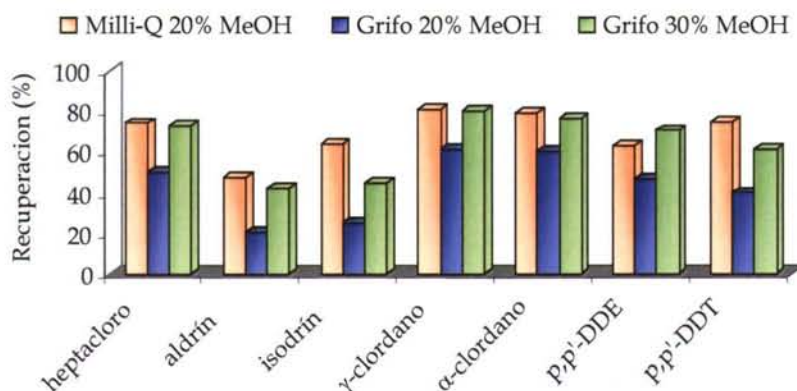


Figura IV-16. Recuperaciones analíticas (%) con porcentajes diferentes de MeOH en agua de abastecimiento y comparación con agua Milli-Q.

Este porcentaje de metanol necesario se incrementa hasta un 40% en el caso del agua de manantial y el agua de pozo, siendo insuficiente en el caso del agua de río, donde aldrín e isodrin no se recuperan, y las recuperaciones analíticas para p,p'-DDE y p,p'-DDT no llegan al 50%.

Estos resultados parecen indicar la existencia de fenómenos de adsorción de estos pesticidas a la materia orgánica presente en las muestras. Aunque la adición de una mayor cantidad de metanol a la muestra de agua antes de realizar la sobrecarga parece reducir la adsorción del patrón añadido, el metanol no libera los pesticidas que ya se encuentran adsorbidos a la misma. Esto significa que aquellos compuestos que se encuentran en la muestra adsorbidos a la materia orgánica no pueden ser extraídos por el método de extracción propuesto, y solo se podría determinar la fracción de pesticidas que se encuentra disuelta.

En el caso de que se quieran determinar los pesticidas adsorbidos a la materia orgánica presente en la muestra de agua, sería necesario filtrar la muestra, y extraer posteriormente ese filtro con un método de extracción de matrices sólidas, como puede ser la extracción con energía de microondas o la extracción con líquidos a presión (PLE).

4.3. Adsorción en la etapa de filtrado

En la extracción en fase sólida de muestras de aguas empleando tanto discos como cartuchos, normalmente es necesaria una etapa de filtrado previo a la extracción de las muestras, con el fin de eliminar el material particulado presente en la misma que podría obturar los poros del adsorbente. Los filtros más ampliamente utilizados son los de fibra de vidrio [Lacorte y cols., 2000], Teflón [Aguilar y cols., 1999], Nylon [Masqué y cols., 1998], o de ésteres de celulosa [House y Ou, 1992] con tamaños de poro que varían entre 0.45 o 0.7 μm .

Sin embargo, y dependiendo de su carácter hidrofóbico, algunos pesticidas pueden ser adsorbidos en los filtros [House y Ou, 1992]. Este comportamiento ha sido observado también para otros compuestos no polares como PCBs y PAH [Wolska y cols., 1999a]. Estas pérdidas por adsorción no son detectadas cuando el patrón se añade al agua después de realizar el filtrado de la muestra, provocando errores en la determinación.

En este trabajo se ha evaluado la adsorción de los pesticidas organoclorados estudiados sobre distintos tipos de filtros de membrana. Para ello a 500 mL de agua Milli-Q, a la que se añadió un 20% de metanol, se le adiciona 1 mL de patrón de pesticidas de 0.05 $\mu\text{g/mL}$, y se hace pasar a través del filtro a estudiar. Éste se seca mediante aspiración a vacío durante 30 min y posteriormente se eluye con 10 mL de acetato de etilo y 10 mL de hexano recogidos juntos, que se concentran y redisuelven del mismo modo que se indicó en el proceso de extracción.

Los filtros ensayados son:

- Filtro de membrana de celulosa de tamaño de poro 0.45 μm Millipore.
- Filtro de membrana de nylon de tamaño de poro 0.2 μm Lida.
- Filtro de PTFE (Teflón) con tamaño de poro 0.45 μm Lida.
- Filtro de fibra de vidrio (MNGF-6) con tamaño de poro 0.6 μm Macherey Nagel.

En la figura IV-17 Se muestra el porcentaje de pesticida que ha sido adsorbido por cada tipo filtro (es decir, la cantidad de pesticida que se recoge al eluir el filtro).

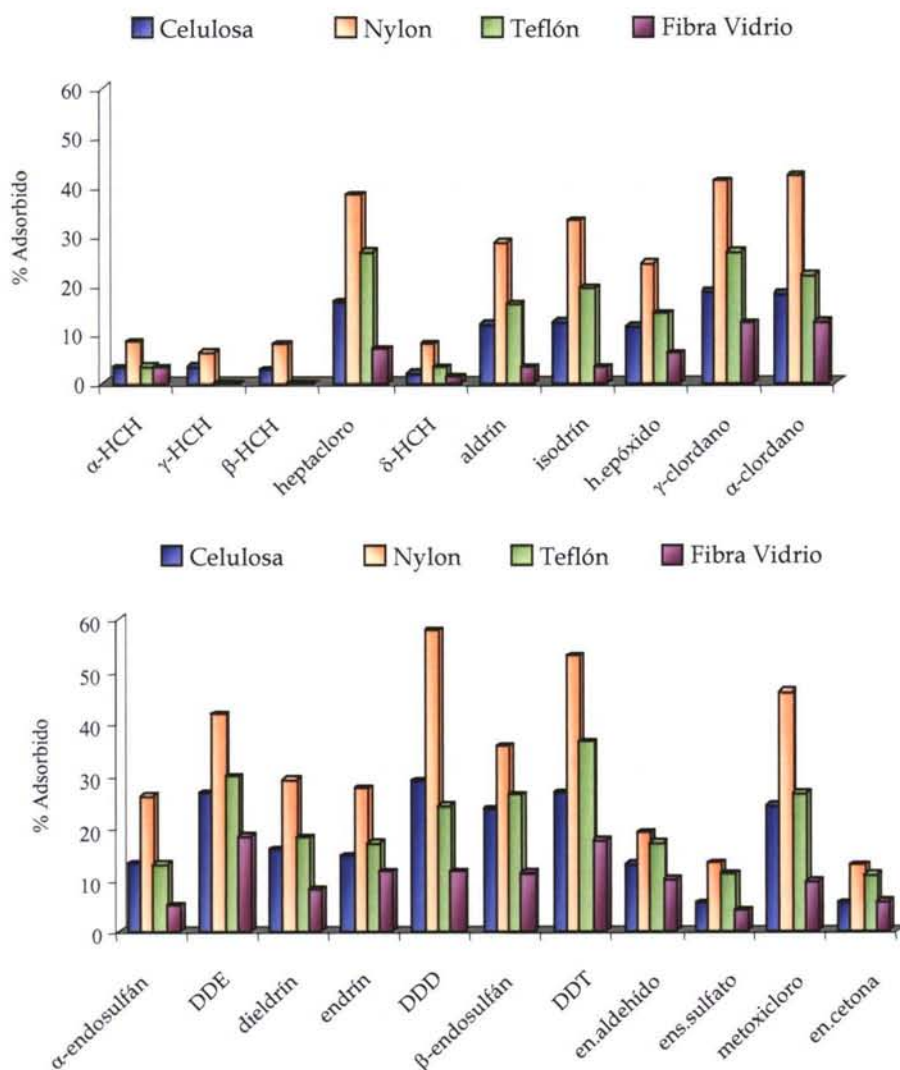


Figura IV-17. Porcentaje de los pesticidas adsorbidos por los filtros.

Todos los filtros probados, a pesar de sus distintos materiales y tamaños de poro, presentaron adsorción de los pesticidas analizados. Los compuestos más

retenidos en los filtros son heptacloro, α y γ -clordano, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT y metoxicloro, aunque muchos otros se retienen también de manera importante. Los compuestos menos retenidos son aquellos que son más solubles en agua, como por ejemplo los isómeros de HCH.

La adsorción es mayor en los filtros de nylon (casi un 60% para p,p'-DDD), sin embargo hay que recordar que estos filtros son los que presentan menor tamaño de poro. Los filtros que menos adsorben son los de fibra de vidrio, siendo aun así la adsorción para p,p'-DDE y p,p'-DDT de un 20%. Esto supone un problema cuando se analizan muestras acuosas con un bajo contenido en pesticidas, y por tanto esta etapa debe ser evitada siempre y cuando sea posible. En caso contrario, estas pérdidas han de ser tenidas en cuenta a la hora de dar los resultados.

Cuando se emplean discos laminares para llevar a cabo la extracción, la etapa de filtrado previo puede ser eliminada, debido a que por la disposición de las fibras en el lecho los poros no se obturan con facilidad, evitando así las pérdidas producidas por esta etapa.

5. RESUMEN Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE SPE DESARROLLADO

A continuación se presenta un esquema (figura IV-18) en el que se resume el proceso desarrollado para la extracción de pesticidas organoclorados en muestras de agua empleando extracción en fase sólida.

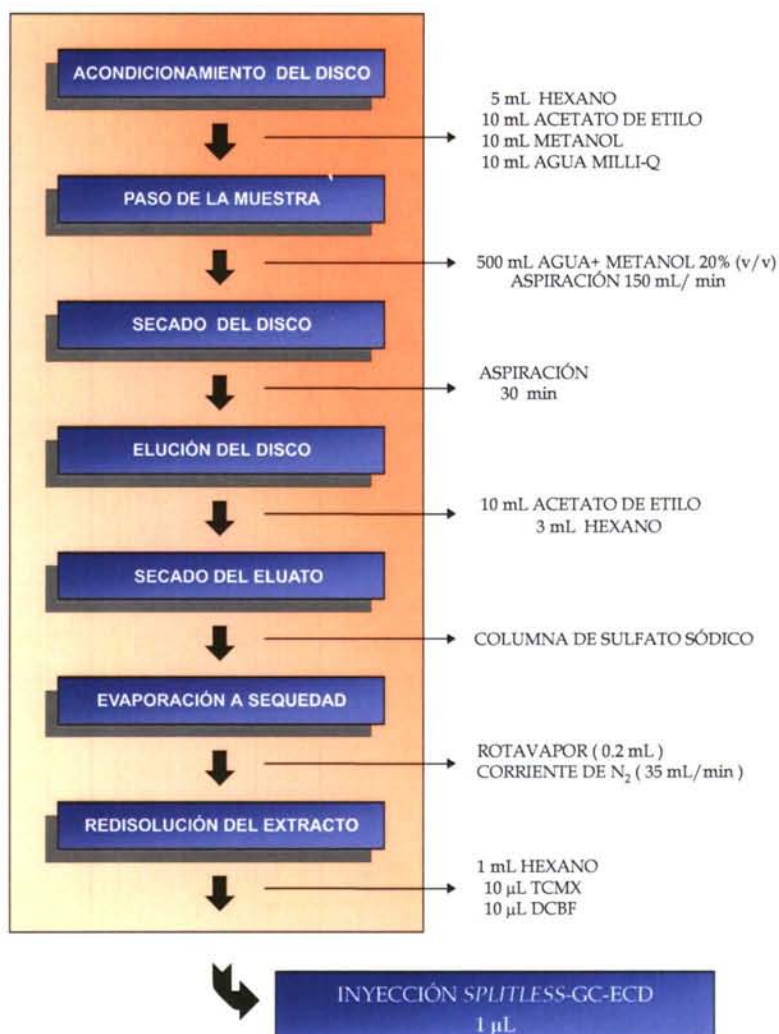


Figura IV-18. Esquema del proceso desarrollado para la extracción de pesticidas organoclorados en aguas empleando discos SPE laminare.

Como se puede ver en el esquema, el porcentaje de metanol añadido a la muestra para evitar la adsorción de los pesticidas al material es del 20%.

Como no se dispone de materiales de referencia certificados para la determinación de pesticidas en muestras de aguas, la validación del método propuesto se ha llevado a cabo mediante el estudio de las recuperaciones analíticas en agua Milli-Q. Los porcentajes de recuperación y desviaciones

estándar relativas que se obtienen para los pesticidas estudiados son satisfactorias y se muestran en la tabla IV-3 en la columna A (n=4).

Tabla IV-3. Recuperaciones analíticas (%) y desviaciones estándar relativas (%) obtenidas en este trabajo (A), en el método EPA 508.1 (B) y por otros autores (C-F) a distintos niveles de concentración.

	A (n=4)	B (n=8)	C (n=4)	D	E	F (n=4)
<i>Concentración</i>	0.1 µg/L	0.048 µg/L	0.4 µg/L	0.5 µg/L	0.002-2 µg/L	1 µg/L
Pesticidas						
α-HCH	98 (2.6)	109 (10)	64 (11)	87	82 (17)	81 (16)
γ-HCH	96 (4.6)	111 (13)	69 (12)	80	91 (7)	90 (31)
β-HCH	104 (3.8)	91 (3.6)	83 (10)	83.9	98 (4)	99 (13)
Heptacloro	73 (10)	83 (9.8)	48 (12)	121	92 (10)	-
δ-HCH	97 (7.5)	120 (8.8)	68 (9)	80	-	107 (12)
Aldrín	46 (15)	70 (11)	49 (11)	88	62 (12)	-
Isodrín	64 (10)	-	45 (13)	-	-	-
Heptaclorepóxido	94 (3.9)	100 (6.6)	64 (10)	88.4	94 (5)	-
γ-Clordano	82 (6.4)	93 (5.4)	-	-	61 (12)	131 (5.4)
α-Clordano	83 (9.8)	98 (4.8)	-	-	-	147 (2.7)
α-Endosulfán	96 (6.4)	102 (7.5)	70(10)	82.6	96 (5)	74 (5)
p,p'-DDE	63 (6.7)	95 (8.3)	-	95.1	15 (22)	-
Dieldrín	96 (7.0)	101 (4.0)	67 (10)	80.7	84 (6)	-
Endrín	98 (7.6)	111 (8.2)	80 (9)	85.2	96 (7)	-
p,p'-DDD	92 (7.6)	108 (5.8)	-	82.6	48 (21)	-
β-Endosulfán	102 (7.9)	106 (7.8)	79 (8)	98.7	87 (9)	74 (2)
p,p'-DDT	74 (9.1)	116 (7.2)	-	89.2	18 (9)	-
Endrín aldehído	101 (5.6)	98 (11)	-	95.3	-	-
Endosulfán sulfato	105 (3.4)	117 (9.3)	86 (6)	88.7	99 (6)	-
Metoxicloro	92 (5.5)	109 (9.5)	90 (6)	111.9	-	-
Endrín cetona	90 (5.7)	-	-	-	-	-

A: resultados obtenidos en este trabajo; B: método EPA 508.1; C: Viana y cols., 1996; D: Chee y cols., 1996; E: Miliadis, 1998; F: Almeida-Azevedo y cols., 2000.

Además, se ha realizado la comparación de las eficacias de extracción obtenidas con los resultados del método EPA 508.1 [EPA-508.1, 1995] y con los obtenidos por otros autores que emplean el mismo adsorbente (C₁₈) (C-E) y los nuevos discos poliméricos Oasis (F).

A la vista de los datos presentes en la tabla IV-3 se puede afirmar que el método desarrollado proporciona buenas recuperaciones analíticas, próximas al 100% para todos los compuestos, aunque algo más bajas para aquellos que presentan pérdidas por adsorción. Estos resultados son comparables a los que se obtienen con el método EPA 508.1 e incluso a los obtenidos con los nuevos materiales poliméricos, aunque hay que tener en cuenta que los resultados que se muestran en la columna F [Almeida-Azevedo y cols., 2000] corresponden a un método multi-residuo en el que se extraen 72 pesticidas de diferente naturaleza.

Por otro lado, los resultados del presente trabajo mejoran los obtenidos por otros autores (C-F). Los mejores resultados de los autores D y E para los compuestos que presentan pérdidas por adsorción (heptacloro y aldrín) son debidos a la elevada concentración a la cual se realizan estos ensayos (0.5 y 2 µg/L respectivamente), que minimizan estas pérdidas.

La precisión obtenida es satisfactoria y comparable a las presentadas por los demás autores.

Los límites de detección y cuantificación se calculan como $\bar{x}_b + 3s_b$ y $\bar{x}_b + 10s_b$ (valor medio y desviación estándar del blanco respectivamente), tomando como blanco la señal de fondo que se obtiene al inyectar un extracto de muestra acuosa [Miller y Miller, 1993] (tabla IV-4). Como se puede ver, los límites de detección obtenidos son suficientes para poder analizar los pesticidas estudiados a límites inferiores a los que establece la legislación referente a aguas de consumo público (< 0.03 µg/L), que es la más exigente para este tipo de matriz.

Tabla IV-4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos con el método de extracción SPE propuesto.

Pesticidas	LD (ng/L)	LC (ng/L)	Pesticidas	LD (ng/L)	LC (ng/L)
α -HCH	0.13	0.35	p,p'-DDE	0.31	0.83
γ -HCH	0.15	0.41	Dieldrín	0.21	0.56
β -HCH	0.34	0.89	Endrín	0.29	0.77
Heptacloro	0.23	0.62	p,p'-DDD	0.35	0.92
δ -HCH	0.16	1.04	β -Endosulfán	0.25	0.66
Aldrín	0.33	0.86	p,p'-DDT	0.53	1.40
Isodrín	0.25	0.66	Endrín aldehído	0.34	0.89
Heptaclorepóxido	0.19	0.50	Endosulfán sulfato	0.29	0.78
γ -Clordano	0.22	0.58	Metoxicloro	1.15	3.03
α -Clordano	0.22	0.58	Endrín cetona	0.28	0.75
α -Endosulfán	0.21	0.55			

6. REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DE MUESTRA MEDIANTE USO DE LA INYECCIÓN PSS-GC-ECD

Como ya se ha explicado en el capítulo III, el uso de inyector de grandes volúmenes, como es el inyector PSS, permite reducir el volumen de muestra necesario para llevar a cabo la extracción al mejorar los límites de detección del método. Esto resulta de gran importancia cuando se analizan ciertas muestras (como orina, sangre etc...) de las cuales resulta difícil conseguir una gran cantidad, y para las cuales es necesario alcanzar límites de detección muy bajos.

En el caso del análisis de muestras acuosas, el problema no suele ser el disponer de la cantidad de muestra necesaria para alcanzar los límites establecidos por la legislación, sino que radica más bien en el transporte y almacenaje de las mismas, dado que para cada muestra suele ser necesario un volumen comprendido entre 500-1000 mL. Reduciendo el volumen de muestra a extraer se reduce también el tiempo necesario para llevar a cabo el paso de la muestra a través del disco, que aunque en el caso de los discos laminares no

supone una gran reducción de tiempo, si lo es cuando se emplean discos de extracción en fase sólida clásicos.

En este trabajo se propone llevar a cabo la extracción de 50 mL de muestra acuosa con los discos laminares de C_{18} según el procedimiento resumido en la figura IV-18, inyectando posteriormente el extracto en un cromatógrafo con inyector PSS y ECD en las condiciones optimizadas en el apartado 6 del capítulo III. Con este procedimiento se consiguen alcanzar los límites más restrictivos que establece la legislación para aguas destinadas al consumo humano ($0.03 \mu\text{g/L}$).

Con este procedimiento se ha analizado un lixiviado procedente de un área contaminada por residuos de isómeros de HCH. En la figura IV-19 se muestra el cromatograma obtenido. En esta muestra se han encontrado α -HCH ($0.022 \mu\text{g/L}$), β -HCH ($2.5 \mu\text{g/L}$), γ -HCH ($0.093 \mu\text{g/L}$), y δ -HCH ($0.13 \mu\text{g/L}$).

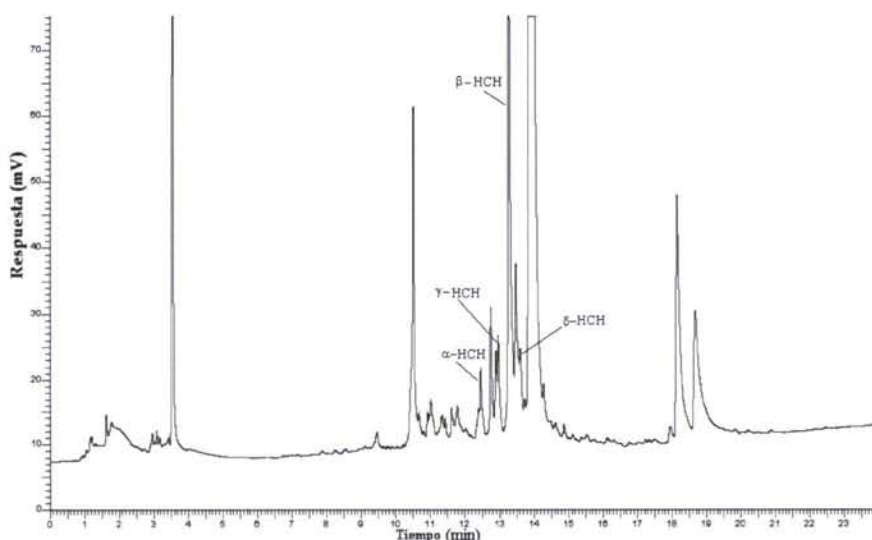


Figura IV-19. Cromatograma obtenido tras la inyección PSS-GC-ECD de un extracto de lixiviado.

7. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Teniendo en cuenta los bajos límites de detección que se han obtenido con la inyección *on-column* de grandes volúmenes, y de acuerdo con el criterio de intentar reducir al máximo los volúmenes de muestra y de disolvente empleados, se ha llevado a cabo el estudio de un método de microextracción líquido-líquido para análisis de aguas.

El método que se va a emplear se ha basado en el descrito en el método EPA 505, en el cual 35 mL de muestra son extraídos con 2 mL de hexano inyectados en un cromatógrafo con inyector *split/splitless* [EPA-505, 1995].

En este trabajo, el volumen de muestra procesado es de 10 mL, siendo el disolvente de extracción seleccionado el acetato de etilo (2mL). Se ha seleccionado este disolvente debido a la gran solubilidad de los pesticidas organoclorados en el mismo. Además es inmiscible con el agua, lo que permite llevar a cabo la separación líquido-líquido, y menos denso que el agua (al contrario de lo que sucede con el diclorometano), lo que permite llevar a cabo la extracción en un vial e incluso automatizar el proceso. El proceso de extracción se lleva a cabo mediante agitación de la muestra, a la que se le ha añadido el disolvente de extracción, durante 1 minuto. El extracto obtenido se seca mediante adición de sulfato sódico anhidro, ya que la presencia de agua en el mismo puede dañar el sistema cromatográfico.

Antes de llevar a cabo la extracción, a cada muestra se le añade decaclorobifenilo (DCBF) como patrón de recuperación (*surrogate*), para así controlar en cada extracción la eficacia de la misma. Se ha escogido este compuesto ya que es uno de los que se emplean habitualmente como patrón interno en el análisis de pesticidas. Se ha intentado usar el dibutilclorendato, un patrón empleado también habitualmente en el análisis de pesticidas organoclorados, sin embargo no fue posible dado que coeluye, en las condiciones puestas a punto, con los compuestos de interés. Además, al extracto final que se inyecta en LVOC-GC-ECD, se le añadió TCMX como patrón interno, para corregir las desviaciones que se pueden producir durante la inyección debidas a la posible

presencia de agua en el extracto, que afecta a la etapa de evaporación y eliminación del disolvente.

El proceso de extracción que se propone es el que se muestra en la figura IV-20.

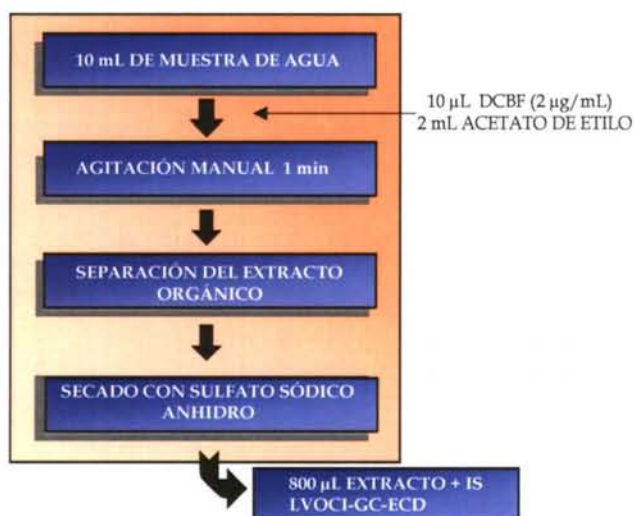


Figura IV-20. Esquema del proceso de microextracción líquido-líquido propuesto.

El estudio de la recuperación analítica para el método de extracción propuesto se llevó a cabo mediante adición del agua Milli-Q con una disolución patrón de pesticidas (40 µL de patrón de 0.05 µg/mL).

Las recuperaciones analíticas se calcularon mediante el factor de respuesta relativo (RRF, *relative response factor*) para cada pesticida. Éste se determina para un patrón, al que se le añadió la misma cantidad de patrón de recuperación que a la muestra, según la siguiente fórmula:

$$RRF_{\text{compuesto}} = \frac{(A_{\text{compuesto}}) \times (C_{\text{surrogado}})}{(A_{\text{surrogado}}) \times (C_{\text{compuesto}})}$$

Donde A es el área del pesticida en el patrón y C la concentración en el mismo. La cantidad de cada pesticida en la muestra (se ha calculado masa de

compuesto y no concentración para evitar errores debido al volumen), se calcula según la ecuación:

$$M_{\text{compuesto}} = \frac{(A_{\text{compuesto}}) \times (M_{\text{surrogado-añadida}})}{(A_{\text{surrogado}}) \times (RRF_{\text{compuesto}})}$$

Donde M es la masa del compuesto en la muestra, y dividiendo este valor por el volumen de muestra procesado, se obtendrá la concentración del analito en la muestra.

Las recuperaciones analíticas obtenidas son satisfactorias (tabla IV-5), aunque son algo elevadas para algunos de los pesticidas debido probablemente a que el comportamiento analítico del patrón de recuperación seleccionado es algo diferente del de estos compuestos. En el caso del endrín aldehído se ha encontrado que este pico se encuentra interferido obteniéndose una señal anómalamente alta. Esta interferencia puede ser debida al sulfato sódico añadido.

La buena precisión del método queda patente a la vista de las desviaciones estándar relativas que se muestran en la tabla, con valores inferiores al 1.5% en todos los casos.

Tabla IV-5. Recuperaciones analíticas y desviaciones estándar relativas (DER) del proceso de microextracción líquido-líquido propuesto.

Pesticida	Recuperación (%)	DER (%)
α -HCH	100	0.9
γ -HCH	140	1.0
β -HCH	142	0.9
Heptacloro	127	0.2
δ -HCH	82	0.6
Aldrín	157	0.9
Isodrín	86	0.4
Heptaclorepóxido	147	0.3
γ -Clordano	117	0.7
α -Clordano	116	0.9
α -Endosulfán	121	1.2
p,p'-DDE	117	0.9
Diendrín	115	0.9
Endrín	115	0.8
p,p'-DDD	116	1.3
β -Endosulfán	125	1.0
Endrín aldehído	-	-
p,p'-DDT	191	0.8
Endosulfán sulfato	131	0.9
Metoxicloro	170	0.9
Endrín cetona	182	0.9

Se ha realizado la extracción de agua Milli-Q a la que se añadió un patrón de pesticidas al nivel de concentración más restrictivo que establece la legislación española en el Real Decreto 140/2003 para aguas destinadas al consumo público, que para aldrín, diendrín, heptacloro y heptaclorepóxido es de 0.03 $\mu\text{g/L}$. A la vista del cromatograma que se obtiene, y que se muestra en la figura IV-21, se comprueba que con el método propuesto es posible determinar los pesticidas a estos niveles. Como se puede ver en la figura la señal del endrín aldehído (17) aparece interferida, como ya se había comentado anteriormente.